

FLÁVERA CAMARGO PRADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE
BEBIDA PROBIÓTICA À BASE DE ÁGUA DE COCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Processos Biotecnológicos, Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2007

Aos meus filhos
Cecília, Marina, Filipe e Cibebe.
A meu esposo
Marinho,
dedico com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação, incentivo e principalmente pela confiança.

Ao professor Dr. Jose Luis Parada, pelas várias contribuições na execução da parte prática e na avaliação da tese.

À professora Dra. Luciana P. S. Vandenberghe pelo incentivo, amizade e colaboração na avaliação do documento escrito.

Aos professores da banca examinadora, Dra. Elza Iouko Ida (UEL), Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna (UFSC), Dra. Sônia Cachoeira Stertz (UFPR) e Dr. Renato João Sossela de Freitas (UFPR) por terem aceitado participar da avaliação desta tese, pelo tempo dedicado nas correções e pelas valiosas contribuições.

Aos professores Dra. Adriane B. P. Medeiros, Dra. Adenise L. Woiciechowski e Dr. Julio Cesar de Carvalho, pelo apoio e amizade.

À Prof. Dra. Vanete Thomas Soccol, por ter concedido a realização dos testes de identificação molecular no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

À Dra. Yanê Carvalho, pela condução dos experimentos de identificação molecular e pelo auxílio na parte de interpretação dos resultados.

Ao colega Daniel Granato, pelo grande auxílio na elaboração e aplicação dos testes de análise sensorial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, da Universidade Federal do Paraná e a CAPES, pelo suporte financeiro concedido durante o doutorado.

À grande amiga Mitiyo Fukuda Miyaoka, pela colaboração durante toda a execução deste trabalho, mas principalmente pelos anos de convivência e pela amizade sincera.

À colega Sascha Habu, pelo incentivo e colaboração na parte de análise microbiológica da bebida.

Aos colegas dos Laboratórios de Processos Biotecnológicos I e II, Cristine, Michele, Giselle, Mariana, Fernanda, Herta, Marlene, Cristina, Débora, Arakaki, Gessiel, Baiana, Juliana, Bruno, Carol Caron, Carol Maria, Carol Tiemi, Letti, Augustus, Susan, Adriana, Camila, João, Chico, Marcelo, pela colaboração, troca de experiências e amizade, e a todos com quem convivi durante o período do Doutorado.

Aos meus pais, Vera e Flávio, por minha formação moral e pelo apoio emocional.

À Deus, que sempre me apontou uma direção nos momentos mais difíceis e permitiu a finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 ÁGUA DE COCO.....	4
2.1.1 Produção de Coco Verde.....	6
2.1.2 Água de Coco: Composição e Propriedades Físico-Químicas.....	9
2.1.3 Benefícios e Usos da Água de Coco.....	11
2.1.4 Qualidade e Conservação da Água de Coco.....	12
2.1.5 Enzimas Presentes na Água de Coco.....	13
2.1.6 Comercialização da Água de Coco.....	13
2.1.7 Industrialização da Água de Coco.....	14
2.2 PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS POR FERMENTAÇÃO.....	17
2.3 FERMENTAÇÃO LÁCTICA.....	19
2.3.1 Bactérias Lácticas.....	20
2.3.1.1 Identificação de bactérias lácticas.....	22
2.3.1.2 Gênero <i>Lactobacillus</i>	23
2.3.1.3 Gênero <i>Bifidobacterium</i>	25
2.3.1.4 Compostos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas.....	26
2.3.1.5 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas.....	28
2.3.2 Influência de Fatores Ambientais na Fermentação Láctica.....	29
2.3.3 Culturas Mistas na Fermentação Láctica.....	30
2.4 PROBIÓTICOS.....	31
2.4.1 Definição de Probiótico.....	32
2.4.2 Efeitos Benéficos dos Probióticos.....	32
2.4.3 Características Essenciais dos Probióticos.....	35
2.4.4 Espécies Microbianas mais Utilizadas como Probióticos.....	37
2.4.5 Produtos Probióticos.....	39
2.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	41
2.5.1 Prebióticos.....	42
2.5.2 Simbióticos.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 ÁGUA DE COCO.....	45
3.1.1 Caracterização Físico-Química da Água de Coco.....	45
3.1.2 Análise Estatística.....	46
3.2 MICRORGANISMOS.....	46
3.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DA MICROBIOTA DO COCO VERDE.....	47
3.3.1 Manutenção das Cepas Isoladas.....	47
3.4 SELEÇÃO DAS CEPAS.....	47
3.4.1 Coloração de Gram e Características Microscópicas.....	48
3.4.2 Prova da Catalase.....	48
3.4.3 Produção de Gás a Partir de Glicose.....	48
3.4.4 Quantificação de Açúcares e Ácidos Orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	49
3.4.5 Atividade Inibitória Frente a Microrganismos Patogênicos.....	50

3.5 ESTUDO DO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS CEPAS ESCOLHIDAS PARA PRODUÇÃO DA BEBIDA.....	51
3.5.1 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Níveis de pH	52
3.5.2 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de Bile	52
3.5.3 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de NaCl.....	53
3.5.4 Crescimento das Cepas em Extremos de Temperatura	53
3.5.5 Identificação Bioquímica das Culturas	53
3.5.6 Identificação Molecular das Culturas.....	55
3.5.7 Detecção de Isômeros de Ácido Lático	56
3.5.8 Resistência das Bactérias Frente a Diferentes Antibióticos	57
3.6 PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	58
3.6.1 Inóculos.....	58
3.6.2 Testes com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio	58
3.6.3 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Pura	60
3.6.4 Estudo Cinético com Cultura Pura.....	61
3.6.5 Estabilidade Físico-Química e Microbiológica da Bebida Fermentada com Cultura Pura	61
3.6.6 Tratamento Térmico da Água de Coco	61
3.6.7 Testes com Culturas Mistas.....	62
3.6.8 Contagem de Células Viáveis de Cultura Mista	62
3.6.9 Teste com Prebiótico e Cultura Mista	63
3.6.10 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Mista	63
3.6.11 Estudo Cinético com Cultura Mista	65
3.6.12 Produção da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco	65
3.6.13 Estabilidade Físico-Química e Microbiológica da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco	66
3.6.14 Análise Sensorial da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco.....	67
3.6.15 Avaliação Microbiológica da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco	67
3.6.16 Determinação do Valor Calórico da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO	69
4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS.....	71
4.2.1 Características Morfológicas, Atividade de Catalase e Produção de CO ₂ pelas Cepas Isoladas da Microbiota do Coco Verde	72
4.2.2 Perfil de Produção de Ácidos Orgânicos das Cepas Isoladas	73
4.2.3 Viabilidade das Cepas Isoladas.....	74
4.2.4 Atividade Inibitória Frente a Microrganismos Patogênicos	74
4.3 COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS CEPAS SELECIONADAS PARA PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO	87
4.3.1 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Níveis de pH	89
4.3.2 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de Sais Biliares	92
4.3.3 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de NaCl.....	96
4.3.4 Crescimento das Cepas em Diferentes Temperaturas.....	100
4.3.5 Provas Bioquímicas de Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono	102
4.3.6 Identificação Molecular das Cepas	103
4.3.7 Detecção de Isômeros de Ácido Lático	107
4.3.8 Resistência à Antibióticos	108
4.4 PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO	109
4.4.1 Testes de Crescimento com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio	109
4.4.2 Otimização do pH Inicial e da Taxa de Inoculação	113
4.4.3 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Pura	114
4.4.4 Estudo Cinético com Cultura Pura.....	117
4.4.5 Estabilidade da Bebida Fermentada com Cultura Pura	118
4.4.6 Tratamento Térmico da Água de Coco	119

4.4.7 Testes com Culturas Mistas.....	121
4.4.8 Teste de Crescimento com Prebiótico e Cultura Mista	129
4.4.9 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Mista	130
4.4.10 Estudo Cinético Utilizando Cultura Mista	132
4.4.11 Estabilidade Físico-Química e Microbiológica da Bebida Fermentada com Cultura Mista	134
4.4.12 Análise Sensorial da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco.....	135
4.4.13 Avaliação Microbiológica da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco	138
4.4.14 Caracterização da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco.....	139
5 CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS	143
ANEXOS	156

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– COMPOSIÇÃO MÉDIA DA ÁGUA DE COCOS VERDES COM 7 MESES DE MATURAÇÃO.....	10
TABELA 2	– CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANTES BACTÉRIAS PATOGÊNICAS COMUMENTE ENCONTRADAS EM ALIMENTOS.....	27
TABELA 3	– ESPÉCIES MICROBIANAS MAIS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS.....	38
TABELA 4	– MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS.....	38
TABELA 5	– PRINCIPAIS OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZADOS COMO PREBIÓTICOS.....	43
TABELA 6	– MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO E SUAS RESPECTIVAS PROCEDÊNCIAS.....	46
TABELA 7	– CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA.....	49
TABELA 8	– CONSTITUINTES E RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO DO PADRÃO UTILIZADO NAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	49
TABELA 9	– CEPAS REFERÊNCIA UTILIZADAS NOS TESTES DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	51
TABELA 10	– <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS.....	55
TABELA 11	– ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS TESTES DE RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS.....	58
TABELA 12	– NÍVEIS CODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3 ³⁻¹ PARA CULTURA PURA.....	60
TABELA 13	– NÍVEIS DECODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3 ³⁻¹ PARA CULTURA PURA.....	60
TABELA 14	– NÍVEIS CODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 FATORES PARA CULTURA MISTA.....	64
TABELA 15	– NÍVEIS DECODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 FATORES PARA CULTURA MISTA.....	64
TABELA 16	– CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE DIFERENTES AMOSTRAS DE ÁGUA DE COCO VERDE COM 6-8 MESES DE MTURAÇÃO.....	69
TABELA 17	– COLORAÇÃO DE GRAM, PROVA DA CATALASE E PRODUÇÃO DE CO ₂ PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DA MICROBIOTA DO COCO VERDE.....	73
TABELA 18	– CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ETANOL PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DA MICROBIOTA DO COCO VERDE.....	74
TABELA 19	– SENSIBILIDADE DAS CEPAS ESCOLHIDAS FRENTE A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS.....	108
TABELA 20	– AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS DA ÁGUA DE COCO.....	119
TABELA 21	– MÉDIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO SENSORIAL DA ÁGUA DE COCO E DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO SEM E COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR E AROMA.....	136
TABELA 22	– MÉDIAS OBTIDAS NA COMPARAÇÃO DO SABOR ENTRE AS BEBIDAS FERMENTADAS À BASE DE ÁGUA DE COCO COM A ÁGUA DE COCO SEM E COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR E AROMA.....	138

TABELA 23	–	BALANÇO ENERGÉTICO PARA O CÁLCULO DO VALOR CALÓRICO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	140
TABELA 24	–	VALOR CALÓRICO DE BEBIDAS PROBIÓTICAS DISPONÍVEIS NO MERCADO.....	140

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	– PRODUTOS PROBIÓTICOS ALIMENTÍCIOS E FARMACÊUTICOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL.....	40
QUADRO 2	– REAGENTES UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS D- E L-ÁCIDO LÁCTICO.....	57
QUADRO 3	– VIABILIDADE DE AC-1, B-7 E BFL-9 EM DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	92
QUADRO 4	– VIABILIDADE DE AC-1, B-7 E BFL-9 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE.....	95
QUADRO 5	– VIABILIDADE DE AC-1, B-7 E BFL-9 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	99
QUADRO 6	– RELAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO FERMENTADAS OU NÃO PELAS CEPAS AC-1 E B-7.....	103
QUADRO 7	– PORCENTAGEM DOS ISÔMEROS D- E L-ÁCIDO LÁCTICO PRODUZIDOS PELAS CULTURAS AC-1, B-7 E <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	107
QUADRO 8	– INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 E <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE AÇÚCAR MASCADO, EXTRATO DE LEVEDURA E LEITE DE SOJA.....	109
QUADRO 9	– INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 E <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE EXTRATO DE LEVEDURA, MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E MEL.....	110
QUADRO 10	– INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 E <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE EXTRATO DE LEVEDURA, MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA E LEITE DE COCO.....	111
QUADRO 11	– INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE EXTRATO DE LEVEDURA, MELAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR E PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA.....	112
QUADRO 12	– INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SACAROSE NO INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1.....	113
QUADRO 13	– INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	114
QUADRO 14	– INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PORCENTAGENS DE INOCULAÇÃO NO INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	114
QUADRO 15	– PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS SIMILARES À BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	139

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– CORTE DE UM FRUTO DO COQUEIRO COM SUAS RESPECTIVAS PARTES.....	5
FIGURA 2	– PRINCIPAIS PRODUTOS E SUBPRODUTOS DO COCO-DA-BAÍA E SUAS POSSIBILIDADES DE USO.....	6
FIGURA 3	– MAIORES PRODUTORES MUNDIAIS DE COCO VERDE EM 2005.....	7
FIGURA 4	– PRODUÇÃO ANUAL DE COCO VERDE NO BRASIL ENTRE 1994 E 2004.....	8
FIGURA 5	– DISTRIBUIÇÃO DO PLANTIO DE COQUEIROS ANÃO NO BRASIL.....	8
FIGURA 6	– GRANDES EVENTOS RELACIONADOS À PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS AO LONGO DOS ANOS.....	18
FIGURA 7	– ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.....	21
FIGURA 8	– ESQUEMA GERAL DA FERMENTAÇÃO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	22
FIGURA 9	– DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO TRATO GASTRINTESTINAL.....	33
FIGURA 10	– PATOGENICIDADE DOS MICRORGANISMOS QUE FAZEM PARTE DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	36
FIGURA 11	– RESULTADOS DOS TESTES PARA AS GALERIAS API 50 CH.....	54
FIGURA 12	– ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA.....	59
FIGURA 13	– CRESCIMENTO DIFERENCIAL DE <i>Lactobacillus</i> E <i>Bifidobacterium</i> EM MEIO DE CULTIVO REINFORCED CLOSTRIDIAL ÁGAR COM AZUL DE ANILINA.....	63
FIGURA 14	– FLUXOGRAMA GERAL PARA PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	66
FIGURA 15	– MEIO DE CULTIVO E COLÔNIAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM ÁGAR MRS COM AZUL DE ANILINA.....	72
FIGURA 16	– INIBIÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	75
FIGURA 17	– INIBIÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	76
FIGURA 18	– INIBIÇÃO DE <i>Salmonella typhi</i> EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	77
FIGURA 19	– INIBIÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	77
FIGURA 20	– INIBIÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	78
FIGURA 21	– INIBIÇÃO DE <i>Salmonella typhi</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	79
FIGURA 22	– INIBIÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	80
FIGURA 23	– INIBIÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	80
FIGURA 24	– INIBIÇÃO DE <i>Enterococcus faecalis</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	81

FIGURA 25	– INIBIÇÃO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	82
FIGURA 26	– INIBIÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	83
FIGURA 27	– INIBIÇÃO DE <i>Salmonella typhi</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	83
FIGURA 28	– INIBIÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	84
FIGURA 29	– INIBIÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	84
FIGURA 30	– INIBIÇÃO DE <i>Enterococcus faecalis</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	85
FIGURA 31	– INIBIÇÃO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	86
FIGURA 32	– MICROSCOPIA ÓPTICA DA CEPA AC-1.....	88
FIGURA 33	– MICROSCOPIA ÓPTICA DA CEPA B-7.....	88
FIGURA 34	– MICROSCOPIA ÓPTICA DA CEPA BFL-9.....	89
FIGURA 35	– CRESCIMENTO DE AC-1 EM CALDO MRS COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	89
FIGURA 36	– CRESCIMENTO DE B-7 EM CALDO MRS COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	90
FIGURA 37	– CRESCIMENTO DE BFL-9 EM CALDO RC COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	91
FIGURA 38	– CRESCIMENTO DE AC-1 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE.....	93
FIGURA 39	– CRESCIMENTO DE B-7 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE.....	93
FIGURA 40	– CRESCIMENTO DE BFL-9 EM CALDO RC COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE.....	94
FIGURA 41	– CRESCIMENTO DE AC-1 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	97
FIGURA 42	– CRESCIMENTO DE B-7 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	97
FIGURA 43	– CRESCIMENTO DE BFL-9 EM CALDO RC COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	98
FIGURA 44	– CRESCIMENTO DA CEPA AC-1 EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	100
FIGURA 45	– CRESCIMENTO DA CEPA B-7 EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	101
FIGURA 46	– CRESCIMENTO DA CEPA BFL-9 EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	101
FIGURA 47	– PERFIL BIOQUÍMICO DA FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO PELAS CULTURAS AC-1 E B-7.....	102
FIGURA 48	– PERFIL DE RAPD-PCR OBTIDO COM O <i>PRIMER</i> COC.....	104
FIGURA 49	– PERFIL DE RAPD-PCR OBTIDO COM O <i>PRIMER</i> M13.....	105
FIGURA 50	– PERFIL DE RAPD-PCR OBTIDO COM O <i>PRIMER</i> M14.....	105
FIGURA 51	– DENDROGRAMA DERIVADO DOS PERFIS DE RAPD-PCR UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> COC, M13 E M14.....	106

FIGURA 52	– GRÁFICO DE PARETO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA, EXTRATO DE LEVEDURA E SACAROSE NO CRESCIMENTO DE AC-1.....	115
FIGURA 53	– GRÁFICO DE CONTOURNO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA E DO EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DE AC-1.....	116
FIGURA 54	– GRÁFICO DE CONTOURNO COM A INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE LEVEDURA E DA SACAROSE NO CRESCIMENTO DE AC-1.....	116
FIGURA 55	– VARIAÇÃO DO pH, VIABILIDADE CELULAR E DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	117
FIGURA 56	– VARIAÇÃO DO pH E DA CONTAGEM DE AC-1 DURANTE O ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO.....	118
FIGURA 57	– COLORAÇÃO DA ÁGUA DE COCO APÓS TRATAMENTO TÉRMICO COM E SEM CHOQUE TÉRMICO.....	120
FIGURA 58	– CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE NA ÁGUA DE COCO ANTES E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO.....	121
FIGURA 59	– COMPARAÇÃO DO INCREMENTO DE DENSIDADE ÓPTICA DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS.....	122
FIGURA 60	– COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS.....	122
FIGURA 61	– COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS.....	123
FIGURA 62	– COMPARAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE GLICOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS.....	124
FIGURA 63	– COMPARAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE FRUTOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS.....	124
FIGURA 64	– COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS.....	125
FIGURA 65	– VARIAÇÃO DA CONTAGEM CELULAR DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO.....	126
FIGURA 66	– VARIAÇÃO DO pH DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO.....	126
FIGURA 67	– CONSUMO DE GLICOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO.....	127
FIGURA 68	– CONSUMO DE FRUTOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO.....	127
FIGURA 69	– PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO.....	128
FIGURA 70	– CRESCIMENTO DA CULTURA MISTA EM MEIO SEM ADIÇÃO DE AÇÚCAR, COM ADIÇÃO DE SACAROSE E COM ADIÇÃO DE INULINA.....	129
FIGURA 71	– DIAGRAMA DE PARETO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA, EXTRATO DE LEVEDURA E SACAROSE NO CRESCIMENTO DA MISTURA 1:1:1 DE AC-1, B-7 E BFL-9.....	130
FIGURA 72	– GRÁFICO DE CONTOURNO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA E EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DA MISTURA 1:1:1 DE AC-1, B-7 E BFL-9.....	131
FIGURA 73	– GRÁFICO DE CONTOURNO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SACAROSE E EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DA MISTURA 1:1:1 DE AC-1, B-7 E BFL-9.....	131
FIGURA 74	– VARIAÇÃO DO pH E DA CONTAGEM DE <i>Lactobacillus</i> E <i>Bifidobacterium</i> PARA CULTURA MISTA EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	132

FIGURA 75	–	VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO, GLICOSE E FRUTOSE PARA CULTURA MISTA EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	133
FIGURA 76	–	VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>Lactobacillus</i> E <i>Bifidobacterium</i> APÓS O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO.....	134
FIGURA 77	–	ASPECTO VISUAL DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	135
FIGURA 78	–	PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE COCO E DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO SEM E COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR E AROMA.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	Água de coco
ACP	Água de coco em pó
AM	Açúcar mascavo
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.	<i>Bifidobacterium</i>
C	Citosina
C.V.	Causas de variação
C+	Controle
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
DEBB	Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs	<i>Deoxynucleotides triphosphate</i>
DO ₆₆₀	Densidade óptica a 660 nm
dTTP	<i>Deoxythymidine triphosphate</i>
EL	Extrato de levedura
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EPSs	Exopolissacarídeos
F	Fator de significância
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
G	Guanina
G.L.	Graus de liberdade
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IDO ₆₆₀	Incremento de densidade óptica a 660 nm
kb	Quilobase (equivale a 1000 bases de nucleotídeos)
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
L.	<i>Lactobacillus</i>

LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LS	<i>Lactobacillus sakei</i>
LSJ	Leite de soja
M	Mel
MAC	Meio à base de água de coco
MCA	Melaço de cana-de-açúcar
MH	Mueller-Hinton
MRS	De Man, Rogosa e Sharp
N	Neutralizado
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection
p/v	Peso por volume
<i>Pc.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIS	Proteína isolada de soja
PSH	Proteína de soja hidrolisada
Q.M.	Quadrado médio
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RC	<i>Reinforced Clostridial</i>
RCA	<i>Reinforced Clostridial Agar</i>
S	Sacarose
S.Q.	Soma dos quadrados
spp.	Espécies
SST	Sólidos solúveis totais
subsp.	Subespécie
TQ	Tal qual
U	Unidade internacional de atividade enzimática
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

O uso de microrganismos promotores da saúde em produtos lácteos tem sido um sucesso no mercado de alimentos. Existe grande interesse em ampliar e diversificar esta linha de alimentos funcionais com a introdução de formulações não lácteas. Os objetivos deste trabalho foram o isolamento de bactérias lácticas da microbiota do coco verde e o desenvolvimento de uma bebida probiótica natural fermentada, à base de água de coco. Entre as sete bactérias lácticas isoladas, a cultura AC-1 apresentou características probióticas relevantes. A bebida fermentada à base de água de coco foi produzida com uma mistura de AC-1, B-7 e *Bifidobacterium lactis* BFL-9, na proporção de 1:1:1. Utilizando galerias API 50 CH, AC-1 foi identificada como *Lactobacillus plantarum* 1 e B-7 como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1. Pela identificação molecular, AC-1 apresentou 62,7% de similaridade com *Lactobacillus sakei* e com *Lactobacillus rhamnosus* enquanto B-7 foi apenas 35% similar ao *Lactobacillus acidophilus*. Acompanhou-se o crescimento celular das culturas em água de coco suplementada com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. A adição de 0,12% de extrato de levedura, 3,5 mL % de proteína de soja hidrolisada e 2,3% de sacarose produziu rendimento máximo para a cultura mista em 8 horas de fermentação a 37 °C, com adição de 3% de inóculo. Ao final de 28 dias de armazenamento sob refrigeração, apresentou contagem celular desejável de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de $4,3 \times 10^8$ e 2×10^7 UFC/mL, respectivamente. A bebida fermentada, adicionada de açúcar e aroma de coco, apresentou boas características sensoriais e aceitabilidade dos julgadores. A análise microbiológica realizada no 6º e no 35º dias após o preparo da bebida apontou ausência de *Salmonella* sp. e de Coliformes a 35 °C e a 45 °C. Foi realizado um balanço energético para o cálculo do valor calórico em que a bebida fermentada à base de água de coco, adicionada de açúcar, apresentou apenas 33,5 kcal/100g. Este valor é bem inferior ao valor calórico de produtos probióticos disponíveis no mercado, o que caracteriza a bebida como sendo de baixa caloria. A água de coco pode ser utilizada como um novo veículo não lácteo para o consumo de probióticos, especialmente por consumidores vegetarianos e intolerantes à lactose. O processo biotecnológico desenvolvido para a produção da bebida probiótica à base de água de coco gerou uma patente industrial.

Palavras-chave: água de coco, bebida não láctea, probióticos, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, intolerância à lactose, baixo valor calórico.

ABSTRACT

The use of beneficial microorganisms in dairy products has been a success in the food market. There is great interest in extend and diversify this line of functional foods with the introduction of non-dairy formulations. The aims of this work were the isolation of lactic acid bacteria from green coconut microflora and the development of a probiotic natural fermented beverage from coconut water. Among the seven lactic acid bacteria isolated, AC-1 culture presented relevant probiotic characteristics. The fermented beverage from coconut water was manufactured with a mixture of AC-1, B-7 and *Bifidobacterium lactis* BFL-9, in the proportion of 1:1:1. Using API 50 CH galleries, AC-1 was identified as *Lactobacillus plantarum* 1 and B-7 as *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1. For the molecular identification, AC-1 presented 62.7% of similarity with *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus rhamnosus* while B-7 was only 35% similar to *Lactobacillus acidophilus*. The cellular growth of the cultures in coconut water supplemented with different carbon and nitrogen sources was carried out. The addition of yeast extract 0.12%, hydrolyzed soy protein 3.5 mL % and sucrose 2.3% produced maximum yield to mixed culture in 8h of fermentation at 37 °C, with addition of 3% of inoculum. After 28 days of cold storage, it presented desirable cellular counts of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* of 4.3×10^8 and 2×10^7 CFU/mL, respectively. The fermented beverage added of sugar and coconut aroma presented good sensorial characteristics and acceptability from the appraisers. The microbiological analysis carried out in the 6th and 35th days after the preparation of the beverage pointed absence of *Salmonella* sp. and Coliforms at 35 °C and 45 °C. It was done an energy balance for the calculation of the calorific value where the coconut water fermented beverage with sugar presented only 33.5 kcal/100g. This value is lower than the calorific values of the probiotic beverages available on the market, which characterizes the beverage as low calorie. Coconut water can be used as a new non-dairy vehicle for probiotic consumption, especially by vegetarians and lactose intolerant consumers. The biotechnological process developed for production of the coconut water probiotic beverage generated an industrial patent.

Key words: coconut water, non-dairy beverage, probiotics, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, lactose intolerance, low calorie.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das duas últimas décadas, muita atenção tem sido dada às funções microbianas que afetam a saúde e a nutrição do hospedeiro. O aumento da resistência microbiana aos antibióticos tem renovado o interesse tanto em médicos quanto em cientistas no uso de probióticos e tem levado a descobrir que alguns microrganismos são capazes de proteger o trato gastrointestinal da invasão por bactérias patogênicas ou oportunistas (GISMONDO *et al.*, 1999; FIORAMONTI *et al.*, 2003).

A primeira associação dos probióticos com os benefícios à saúde foi feita em 1908 quando o cientista Russo Eli Metchnikoff associou a longevidade de camponeses búlgaros ao consumo de produtos lácteos fermentados (GISMONDO *et al.*, 1999; FIORAMONTI *et al.*, 2003). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os dois principais gêneros de microrganismos com características probióticas cientificamente comprovadas. O interesse pelos probióticos está diretamente relacionado com a crescente valorização da qualidade de vida e da prevenção de doenças, principalmente nas sociedades afluentes.

Os produtos probióticos disponíveis para uso humano são encontrados em preparações farmacêuticas, na forma líquida ou liofilizada, mas geralmente são vendidos como alimentos lácteos fermentados, principalmente os iogurtes e leites fermentados. Intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite e elevado conteúdo de colesterol são obstáculos relacionados ao consumo de produtos lácteos fermentados. No Brasil, somente 50% da população é capaz de digerir a lactose (CAMARGO, 2006). Além disso, devido ao aumento constante no número de consumidores vegetarianos nos países desenvolvidos, há também um acréscimo na demanda de produtos probióticos isentos de ingredientes de origem animal.

Nos últimos anos observa-se um constante aumento na produção nacional de coco verde. Em 1994, a produção era de 900 milhões de frutos e em 2004 saltou para 2 bilhões de unidades. O Brasil ocupa o quarto lugar entre os maiores produtores mundiais de coco (FAO, 2005). Em virtude deste aumento anual da produção de coco-verde no Brasil é necessário buscar novas alternativas para evitar uma possível

saturação do mercado consumidor de água de coco. O consumo de água de coco no país é crescente e significativo. A grande demanda é suprida, principalmente, pela extração da água do fruto *in natura*. No ano de 2000 já havia no país cerca de 80 indústrias de pequeno e três de grande porte envasando a água de coco, que concorre diretamente com o mercado de refrigerantes. O consumo de água de coco representa 1,4% deste mercado, ou seja, 140 milhões de litros (CARRIJO, 2002).

O envasamento da água de coco associado a algum método de preservação permite a comercialização de grande volume de água sem o inconveniente da casca do coco, reduzindo assim os custos de transporte (FONTES e WANDERLEY, 2006)

O custo da água de coco varia muito no mercado consumidor. O preço médio do fruto que em 1998 era de R\$ 0,35 chegou a R\$ 0,21 em 2001. Segundo o presidente do Grupo de Coco do Vale, Aluísio Gomes, “é necessário agregar valor e escoar a produção de forma rentável para os produtores e acessível aos consumidores” (HERBÁRIO, 2002).

Aproveitando essa riqueza natural renovável, o homem tem empregado a água de coco de forma crescente na alimentação e nutrição, na medicina em pacientes desidratados ou em atletas com exaustão física pela reposição de potássio, e na biotecnologia, na conservação de sêmen de caprinos, ovinos, suínos e aves, na indução de diferenciação de células, entre outras aplicações (ARAGÃO *et al.*, 2005).

Uma vez exposta ao ar, a água de coco inicia um processo fermentativo, reduzindo rapidamente sua qualidade. Assim, a produção de bebidas à base de água de coco tem sido alvo de interesse de muitas indústrias. A presente tese de doutorado foi realizada com o intuito de desenvolver um novo produto à base de água de coco, com propriedades probióticas. O processo de produção da bebida gerou uma patente industrial.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo tecnológico para produção de uma bebida fermentada à base de água de coco com propriedades probióticas, destinada ao consumo humano.

Entre os objetivos específicos estão:

- isolar bactérias lácticas da microbiota do coco verde;
- caracterizar as bactérias lácticas isoladas;
- utilizar as bactérias lácticas isoladas no desenvolvimento de uma nova bebida natural com características probióticas;
- produzir uma bebida fermentada não láctea, à base de água de coco, com boas características sensoriais, contribuindo para a introdução do produto no mercado consumidor (patente industrial apresentada no anexo 1);
- agregar valor à água de coco, fornecendo uma alternativa para captar um possível excesso na disponibilidade de coco verde, em razão do constante aumento na produção do fruto no Brasil;
- oferecer uma nova opção de veículo para o consumo de bactérias probióticas por consumidores vegetarianos ou que apresentem intolerância à lactose ou alergia às proteínas do leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÁGUA DE COCO

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é importante na geração de renda, na alimentação e na obtenção de mais de cem produtos, em aproximadamente 90 países localizados na zona intertropical do globo terrestre. Constitui a mais importante das culturas perenes, capaz de gerar um sistema auto-sustentável de exploração. Isto é verificado em vários países do continente asiático, onde é importante fonte geradora de divisas e também principal fonte de proteínas e calorias da população (CUENCA, 1998).

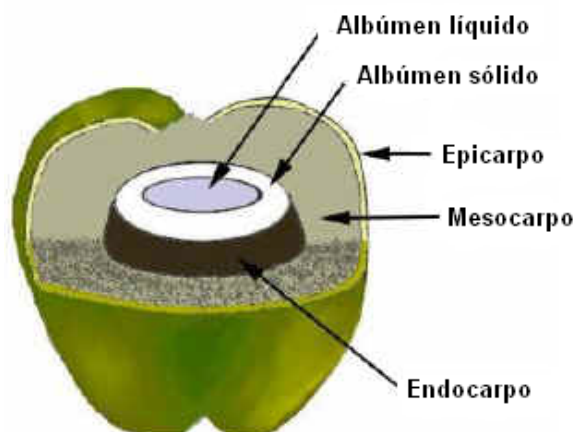
O coco é o fruto do coqueiro, da família das palmáceas, a qual abrange cerca de um milhão de espécies. O gênero *Cocos* é constituído apenas pela espécie *Cocos nucifera* L., que é composta de algumas variedades. As mais importantes são a *Typica*, conhecida como variedade gigante, a qual é destinada principalmente à agroindústria do coco; e a *Nana*, conhecida como variedade anã e utilizada prioritariamente no consumo de água de coco (RGNUTRI, 2002; ARAGÃO, 2003).

O fruto do coqueiro (figura 1) é formado por uma epiderme lisa ou epicarpo, que envolve o mesocarpo espesso e fibroso, ficando mais para o interior uma camada muito dura, o endocarpo.

A figura 1 mostra também a semente envolvida pelo endocarpo, sendo constituída por uma camada fina e marrom: o tegumento, que fica entre o endocarpo e o albúmen sólido. Este é uma camada carnosa, branca, muito oleosa, formando uma grande cavidade onde se encontra o albúmen líquido: a água de coco. Próximo a um dos orifícios do endocarpo e envolvido pelo albúmen sólido está o embrião (PASSOS, 1998).

Do coqueiro se aproveita praticamente tudo, quer em nível de propriedade rural para autoconsumo pelo produtor, quer para fins de obtenção de renda através da comercialização do fruto para diversas utilizações. O fruto é a parte do coqueiro com maior valor comercial. Pode ser utilizado verde ou maduro (REBELLO *et al.*, 2000).

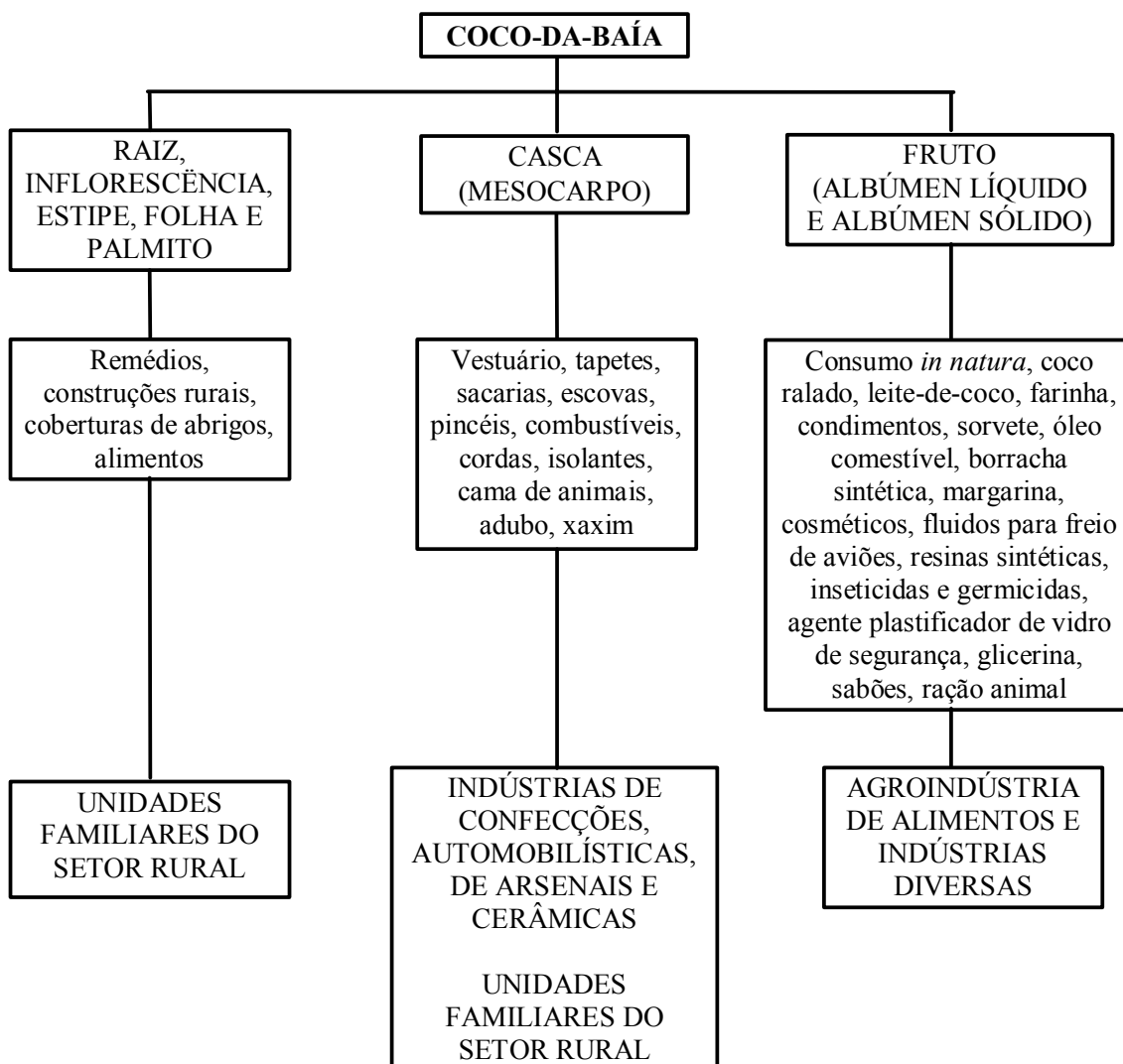
FIGURA 1 – CORTE DE UM FRUTO DO COQUEIRO COM SUAS RESPECTIVAS PARTES



FONTE: WOODROOF, 1979.

O coco verde é explorado no comércio de água de coco e do endosperma gelatinoso. Os frutos maduros são mais utilizados para obtenção da copra ou albúmen sólido, muito usado na produção de óleo de coco. As principais formas de aproveitamento do coqueiro são mostradas na figura 2. Do mesocarpo podem ser extraídas fibras de diversos comprimentos para fabricação de uma vasta quantidade de produtos, constituindo-se como nova alternativa de renda para comunidades rurais produtoras de coco. O endocarpo é usado na produção de alguns tipos de carvão ou, em conjunto com o mesocarpo, é fonte de energia nas caldeiras de indústrias. A copra é muito empregada no mercado internacional para elaboração de óleo comestível. Ainda é utilizada como matéria-prima na fabricação de leite de coco, borracha sintética, margarina, cosméticos, fluidos para freio hidráulico de aviões, resinas sintéticas, inseticidas, germicidas, agente plastificador de vidros de segurança. O coco ralado desidratado é apreciado no mundo inteiro e utilizado em indústrias alimentícias. Do processamento industrial do coco ralado desidratado, podem-se obter três subprodutos: água-de-coco, óleo de coco e a torta. Os dois últimos são elaborados das amêndoas descartadas no processo produtivo. O óleo de coco é utilizado na fabricação de margarinas, álcoois, sabões, detergentes, cosméticos, velas e óleo comestível. A torta de coco tem uso na alimentação animal (REBELLO *et al.*, 2000).

FIGURA 2 – PRINCIPAIS PRODUTOS E SUBPRODUTOS DO COCO-DA-BAÍÁ E SUAS POSSIBILIDADES DE USO



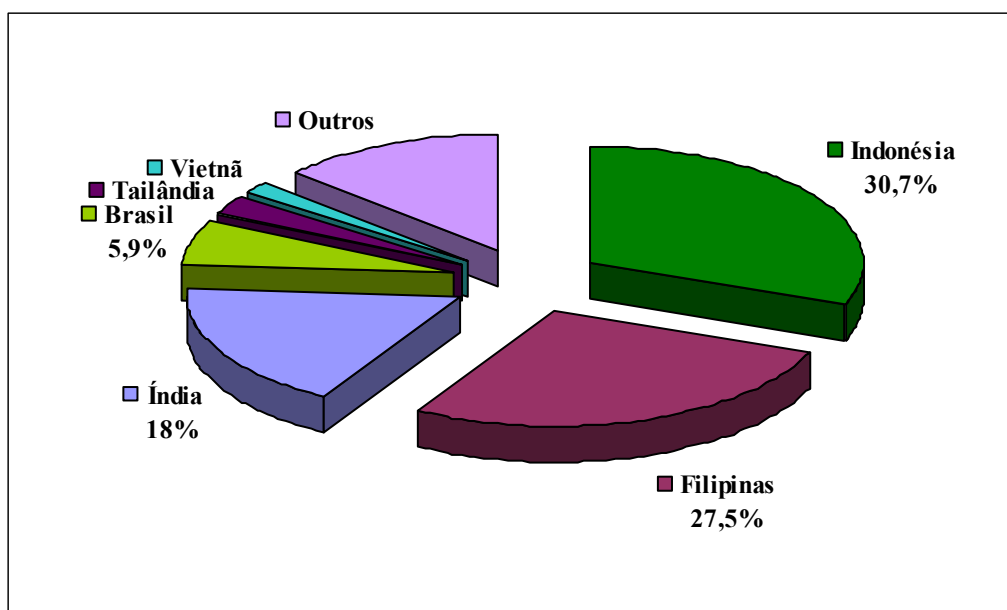
FONTE: REBELLO *et al.*, 2000.

2.1.1 Produção de Coco Verde

A expansão da cultura do coco no Brasil é demonstrada pelo aumento da produção no Estado de São Paulo, que tradicionalmente não é um produtor de coco, mas que nos últimos anos atingiu uma produção média anual de 10 milhões de frutos. O Nordeste do Brasil é responsável por 82,9% da produção nacional de coco (BRITO *et al.*, 2002).

No ano de 2005, foram produzidos 53 milhões de toneladas de coco verde no mundo. Nesse ano, o maior produtor mundial de coco verde foi a Indonésia com 30,7% da produção mundial de coco, seguido das Filipinas 27,5% e da Índia com 18%. O Brasil ficou em quarto lugar entre os maiores produtores mundiais de coco, conforme apresentado na figura 3, com produção anual de 3,12 milhões de toneladas, o que representou 5,9% da produção mundial de coco (FAOSTAT, 2005).

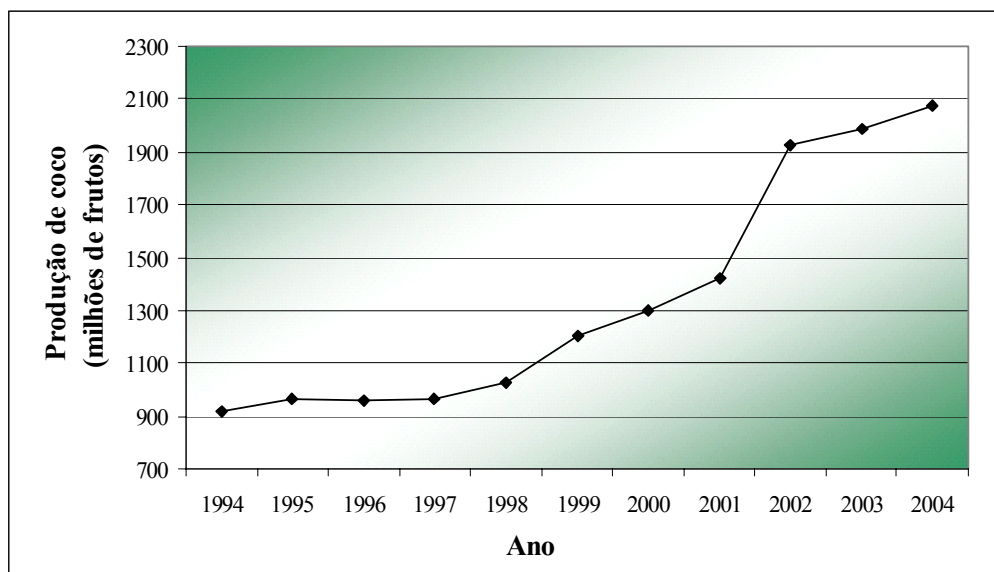
FIGURA 3 – MAIORES PRODUTORES MUNDIAIS DE COCO VERDE EM 2005



FONTE: FAOSTAT, 2005.

Entre 1994 e 1997, a produção anual de coco no Brasil se manteve praticamente estável, mas a partir daí vem aumentando gradativamente a cada ano, conforme a figura 4. O maior salto ocorreu entre os anos de 2001 e 2002.

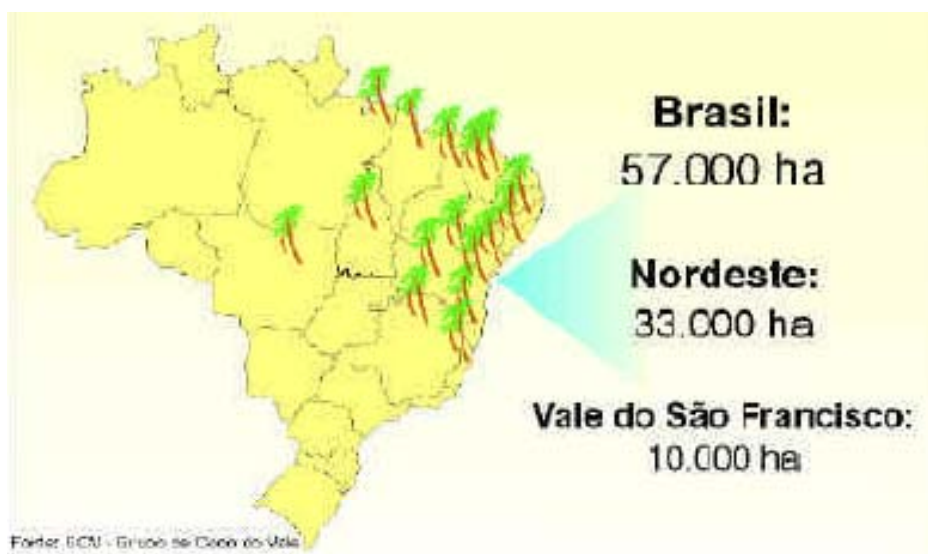
FIGURA 4 – PRODUÇÃO ANUAL DE COCO VERDE NO BRASIL ENTRE 1994 E 2004



FONTE: BRASIL, 2005.

Nos últimos anos houve um expressivo crescimento no plantio de coqueiros no país. Em 2000, a área plantada no país com a variedade anão verde, destinada ao consumo de água de coco *in natura*, era de 57 mil hectares e o plantio era distribuído conforme a figura 5 (SAABOR *et al.*, 2000).

FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO DO PLANTIO DE COQUEIROS ANÃO NO BRASIL



FONTE: GRUPO DE COCO DO VALE citado por SAABOR *et al.*, 2000.

Atualmente, a área plantada é de aproximadamente 80 mil hectares, grande parte da qual em fase de produção. Estes plantios estão distribuídos também em regiões não tradicionais de cultivo, como Sudeste, Centro-Oeste, semi-árido e tabuleiros costeiros do Nordeste (FONTES e WANDERLEY, 2006).

2.1.2 Água de Coco: Composição e Propriedades Físico-Químicas

A água de coco é um isotônico natural existente na cavidade da semente do coco e de grande importância na germinação da semente e na sobrevivência da plântula (ARAGÃO, 2000). A formação da água de coco é uma estratégia ecofisiológica do coqueiro, no sentido de armazenar substâncias nutritivas de reservas para serem utilizadas naturalmente como mecanismo de sobrevivência da espécie durante eventuais estresses ambientais (ARAGÃO *et al.*, 2005).

Independente da cultivar, a água de coco começa a se formar dois meses após a polinização da flor feminina, e alcança seu volume máximo em aproximadamente 6 meses. Entre 6 e 8 meses de idade é que o fruto deve ser colhido para consumo da água de coco *in natura*, pois, além de sua maior quantidade, ela é mais saborosa, rica em nutrientes e isenta de gordura, o que a coloca com destaque para a saúde humana (ARAGÃO, 2000; ARAGÃO *et al.*, 2005).

A água de coco corresponde a aproximadamente 25% do peso do fruto e rende, em média, 300 a 400 mL da bebida por unidade. O sabor da água de coco é doce e levemente adstringente, com pH variando de 4,0 a 6,7. Além de água, é constituída de carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. É uma bebida leve, refrescante e pouco calórica, apresentando em média 20 calorias em 100 mL (ARAGÃO, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2005, DE CARVALHO *et al.*, 2006). A composição química média da água de coco consta na tabela 1.

As quantidades de glicose e frutose dissolvidas na água de coco variam com o grau de maturação dos frutos. No intervalo de 7 a 12 meses ocorre uma queda no teor de açúcar da água de coco de apenas 2%. Isso acontece porque no início da maturação há uma grande quantidade de frutose livre. Com o progresso da maturação, ocorre síntese de sacarose a partir de glicose e frutose, o que favorece a queda do teor de

açúcar, já que a frutose apresenta o teor de doçura maior do que a sacarose. A partir do sexto mês de maturação, observa-se acentuada redução no volume de água no coco, além de queda nos conteúdos de açúcares, sólidos totais, cinzas e minerais. Ao contrário, o teor de gordura e proteínas aumenta significativamente (ARAGÃO, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DA ÁGUA DE COCOS VERDES COM 7 MESES DE MATURAÇÃO

Variável	Quantidade
SST (° Brix)	5,2 a 8,9
Açúcares redutores (%)	1,9 a 5,5
Açúcares não-redutores (%)	0 a 5,9
Glicose (g/L)	19,5
Frutose (g/L)	20,9
Proteínas (mg/L)	3,7
Sódio (mg/L)	47 a 90
Fósforo (mg/L)	25 a 52
Cálcio (mg/L)	100 a 240
Magnésio (mg/L)	38 a 120
Potássio (mg/L)	1430 a 1960
Vitamina C (mg/L)	570

FONTES: ARAGÃO, 2000; ARAGÃO *et al.*, 2003; DE CARVALHO *et al.*, 2006

O principal ácido presente na água de coco é o málico. Outros ácidos estão presentes, mas em quantidades muito pequenas (SREBERNICH, 1998). A legislação brasileira permite a adição de ácido cítrico para correção de acidez de água de coco quando submetida a algum processo de conservação (BRASIL, 2002).

O conteúdo de lipídios e proteínas presentes na água de coco é baixo. Este teor aumenta com a idade do fruto e são dependentes da combinação entre variedade do fruto e safra. A quantidade de proteínas ainda é dependente da interação entre variedade e idade do fruto (SREBERNICH, 1998; JACKSON *et al.*, 2004).

2.1.3 Benefícios e Usos da Água de Coco

A água de coco é considerada um isotônico natural por ser rica em minerais. A presença de eletrólitos, tais como sódio e potássio na água de coco possibilita a uma absorção mais rápida, recuperando as perdas destes minerais através da urina e da pele. Além disso, a água de coco é a única bebida isotônica natural disponível comercialmente. É ideal para repor o líquido perdido depois das atividades físicas, devido ao alto teor de potássio, e para a recuperação nos casos de desidratação por ser um excelente soro vegetal (RGNUTRI, 2002).

A densidade da água de coco é semelhante ao do plasma sanguíneo. Assim, ela pode ser usada como infusão intravenosa em casos de desidratação, devido ao seu pH favorável, presença de aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B, ácido ascórbico e eletrólitos. Por este fato, ela foi utilizada na Segunda Guerra Mundial como soro fisiológico para reequilibrar os líquidos do organismo, durante as cirurgias de emergência (ARAGÃO, 2000).

Em alguns países onde o déficit nutricional é alto, a água de coco é utilizada como substituta de produtos protéicos. Numa análise comparativa entre os aminoácidos do leite e da água de coco, observaram-se semelhanças na composição de ambos. Foi notada maior porcentagem de arginina, alanina, cistina e serina na água de coco, e os demais aminoácidos em proporções menores. O coco tem a vantagem de existir naturalmente em grandes quantidades em países onde a desnutrição é prevalente (ARAGÃO, 2000).

Nas Filipinas e no Sri Lanka, onde a produção de coco é elevada, produz-se o vinagre de água de coco, um líquido claro com um sabor especial de ácido acético e com aroma que lembra o coco. Como a quantidade de açúcar presente na água de coco é baixa, é necessário fazer a correção para chegar a 15% de açúcares. A duração da fermentação acética da água de coco é de aproximadamente 30 dias, fornecendo um vinagre com cerca de 6% de ácido acético (BATTCOCK e AZAM-ALI, 1998).

A água de coco vem sendo muito utilizada em áreas como medicina, biologia, veterinária, biotecnologia e nutrição. Há cerca de duas décadas, a água de coco passou

a despertar o interesse de pesquisadores brasileiros em relação ao potencial do produto como meio de conservação celular (ARAGÃO, 2000).

Pesquisas recentes têm utilizado um componente extraído de uma substância ativa da água de coco como diluente e conservante de sêmen. A substância que promove a conservação do sêmen é um hormônio vegetal, o ácido indol-acético. Esta substância também é capaz de manter a longevidade de células como córneas humanas destinadas a transplante, culturas de tecidos, meios de cultura para vírus, bactérias e células vegetais, e na obtenção de vacinas contra febre aftosa, raiva e leishmaniose (ARAGÃO, 2000).

2.1.4 Qualidade e Conservação da Água de Coco

Quando o coco é verde, sua polpa é pouco desenvolvida e mole, guardando muita água no seu interior. À medida que o coco vai amadurecendo, a parte carnosa se torna mais consistente e a água diminui. O coco verde está adequado para consumo quando sua casca é fibrosa e carnuda, com um tom esverdeado e com o núcleo bem duro. Além disso, a polpa deve apresentar-se tenra com consistência cremosa. O coco fresco, ainda fechado, pode ser conservado por dois meses (RGNUTRI, 2002).

A água no interior do fruto é estéril e se mantém assim, desde que o fruto não sofra nenhuma lesão que possibilite a entrada de microrganismos, mas durante o seu processamento, podem ocorrer alterações microbiológicas e alterações bioquímicas que inviabilizam a sua posterior comercialização, assim o problema da conservação da água de coco se inicia logo após a abertura do fruto. (FILHO, 2005). Uma vez exposto ao ar, o líquido inicia rapidamente um processo fermentativo. A produção de bebidas à base de água de coco, particularmente como subproduto do processamento de coco para obtenção de leite de coco e coco desidratado, tem sido alvo de interesse de muitas indústrias (ARAGÃO, 2000).

2.1.5 Enzimas Presentes na Água de Coco

Devido às alterações indesejáveis que acarretam, as enzimas presentes na água de coco são um fator de grande importância. A atividade enzimática ocorre com plenitude em frutos com idade de 5 a 7 meses e diminui com seu amadurecimento. Um dos principais problemas é o desenvolvimento da coloração rósea devido à presença de polifenoloxidase e peroxidase. Estas enzimas apresentam o máximo de atividade em pH 6,0 e 5,5 e à temperatura de 25 e 35 °C, respectivamente (GALEAZZI, 1984; CAMPOS *et al.*, 1996; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A polifenoloxidase catalisa reações de oxidação de compostos fenólicos, na presença de oxigênio, cujos produtos se polimerizam, formando compostos de cor escura. A peroxidase catalisa reações que estão associadas à deterioração de diversos nutrientes, como o ácido ascórbico e também com o sabor dos alimentos (ROBINSON e ESKIN, 1991).

O tratamento térmico para inativação das enzimas presentes na água de coco só é eficiente acima de 90 °C. Porém, com 90 segundos de exposição a esta temperatura já ocorrem problemas sensoriais relacionados às mudanças no aroma e sabor da água de coco. A redução do pH não é um método eficiente de inativação enzimática, já que a água de coco apresenta características tamponantes. E a refrigeração também não é suficiente para inibição completa da atividade enzimática, pois, à temperatura de 5 °C, o percentual de atividade é de 46% para polifenoloxidase e 39% para peroxidase, em relação à temperatura ótima. Dos aditivos pesquisados, o mais eficiente na inibição das duas enzimas foi o ácido ascórbico (CAMPOS *et al.*, 1996).

2.1.6 Comercialização da Água de Coco

Além da comercialização dos subprodutos do coco, tais como o óleo e o leite de coco, bastante utilizados nas indústrias de alimentos e cosméticos, o consumo de água de coco como bebida refrescante tem aumentado significativamente. Estima-se que no Brasil seu consumo aumente de 1,5% ou 125 milhões de litros, para

4% a 5% em comparação com o consumo de refrigerantes que fica em torno de 10 bilhões de litros por ano (BRITO *et al.*, 2002).

Tradicionalmente a água de coco é comercializada dentro do próprio fruto, o que envolve diversos problemas relativos ao transporte, armazenamento e perecibilidade do produto. O desenvolvimento de técnicas de processamento que permitem o envase da água de coco viabiliza sua comercialização em locais distantes da origem além de garantir melhor conservação e menor exigência de espaço para o transporte. O produto é acondicionado em embalagens longa-vida ou em garrafas plásticas (BRITO *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

O mercado do coco verde no Brasil tem crescido nos últimos anos, verificado pelo aumento do consumo de água de coco e o crescimento das indústrias de envasamento, as quais vêm disponibilizando o produto vigorosamente no varejo (BRASIL, 1998). Também têm ocorrido sinalizações dos EUA, da Comunidade Européia e do Japão, no sentido de importar produtos naturais como água de coco, para competir no mercado de bebidas isotônicas (ARAGÃO *et al.*, 2001).

Novas alternativas têm surgido no mercado, contribuindo para aumentar o consumo da água de coco *in natura*. Uma delas foi a introdução de máquinas de extração de água de coco com o produto servido diretamente ao consumidor; outra alternativa é a exportação do coco verde. A estratégia é inicialmente exportar o coco verde para alavancar o consumo de água de coco envasada. Informações do setor indicam a ampliação das fábricas tradicionais, a construção de novas unidades e o crescimento de pequenas e médias agroindústrias. Esta evolução sinaliza a expansão deste mercado que poderá tornar-se uma saída para um eventual excesso de produção de coco-verde (SAABOR *et al.*, 2000).

2.1.7 Industrialização da Água de Coco

O coco verde não está disponível em todas as partes do país ao longo do ano, com preço uniforme. Além disso, o consumidor está sujeito às variações de quantidade de água dentro do fruto. Estes problemas são resolvidos com o envase da água de coco. Diferentes métodos de preservação têm sido estudados, como por exemplo,

esterilização térmica, filtração, pasteurização, ajuste da quantidade de açúcar, pH e sólidos totais, concentração por osmose inversa, adição de aditivos e carbonatação (BERGONIA, 1982; DEL ROSARIO *et al.*, 1986; DUTTA, 1995). A água envasada é obtida a partir de processos tecnológicos que preservem as características naturais da bebida. Podem ser feitas correções de parâmetros como sólidos solúveis e acidez, podendo-se também utilizar aditivos que prolonguem a vida-de-prateleira do produto. O uso de tratamento térmico em média e alta temperatura, refrigeração ou congelamento podem ser adotados (ARAGÃO *et al.*, 2001; ROSA e ABREU, 2002).

O processo UHT (*ultra high temperature*) garante uma condição de esterilidade comercial, possibilitando estocagem em temperatura ambiente. Este sistema compreende dois estágios: a pasteurização prévia e a esterilização propriamente dita. Na segunda etapa o produto é submetido a temperaturas próximas de 140 °C e, apesar do tempo de esterilização ser de poucos segundos, não só elimina bactérias como também alguns elementos nutritivos e quase todo o delicado sabor característico da água de coco. As indústrias do setor vêm tentando otimizar este processo, minimizando estas modificações (ROSA e ABREU, 2002).

A água envasada e congelada destaca-se como outra forma de conservação muito utilizada. Como a água de coco é um meio extremamente suscetível ao crescimento microbiano, a pasteurização é uma etapa necessária para reduzir os níveis de contaminação, garantindo assim a inocuidade alimentar (ARAGÃO *et al.*, 2001). O congelamento pode ser realizado de diversas formas, de acordo com a escala de produção, embora ocorrendo o mais rápido possível, preserva as características originais do produto (ROSA e ABREU, 2002).

A utilização dos processos de separação com membranas para esterilização a frio da água de coco é uma alternativa em relação aos métodos apresentados. Dentre os processos de separação por membranas, a microfiltração, a ultrafiltração e a nanofiltração são os mais próximos à filtração clássica. As membranas utilizadas são porosas e a seletividade é determinada a partir da relação entre o tamanho e a forma dos solutos a serem fracionados e a distribuição de tamanho dos poros das mesmas. As membranas agem como peneiras moleculares (MAGALHÃES *et al.*, 2005). A

tecnologia da microfiltração é um processo de esterilização a frio capaz de conservar o sabor e todas as propriedades nutritivas. Dependendo das características da membrana utilizada, as enzimas, que são macromoléculas, também podem ser removidas. Moléculas menores como açúcares, vitaminas e sais minerais presentes na água de coco permeiam pela membrana (CABRAL, 2002).

Outra tecnologia que vem recebendo crescente atenção em todo o mundo é a irradiação. Com este processo, o fruto alcança melhor qualidade fitossanitária e conseqüente extensão do estágio de maturação, de forma a estender o período potencial de consumo da água (ARAGÃO *et al.*, 1998).

Como alguns métodos de conservação podem se tornar inviáveis, pelo alto custo das instalações industriais ou do armazenamento, o uso do processo *Hot Fill* ou enchimento a quente como método alternativo de preservação da água de coco foi testado. Além do custo do processo não ser tão elevado, o produto pode ser armazenado a temperatura ambiente. O pH da água de coco foi padronizado em 4,5 com adição de ácido cítrico, e sólidos solúveis totais em 7 °Brix com adição de frutose. Foram adicionados ainda ácido ascórbico como antioxidante (0,13 mg/100 mL), metabissulfito de sódio (45 mg/L) e benzoato de sódio (124 mg/L) como conservantes. A água de coco foi então submetida a tratamento térmico a 90 °C durante 2 minutos, envasada em garrafas de vidro, fechadas hermeticamente e resfriadas. O produto foi acondicionado em temperatura ambiente. O processo *Hot Fill* utilizado apresentou qualidade microbiológica satisfatória e boa aceitação sensorial pelos provadores (COSTA *et al.*, 2005).

O fato do coqueiro ser oriundo de vegetações tipicamente tropicais limita a difusão do uso da água de coco em trabalhos realizados em regiões de clima temperado. Além disso, fatores como variedade, tipo de cultivar, idade, sanidade e fatores ambientais influenciam sua composição, não havendo uma padronização deste insumo. A solução foi encontrada por pesquisadores brasileiros que desenvolveram a água de coco em pó – ACP®. A obtenção do produto ocorre numa seqüência de etapas iniciada pela seleção e higienização do fruto, seguida da extração da água de coco de forma asséptica. O líquido é bombeado de forma contínua para o sistema de secagem.

A amostra seca é transformada em pó fino e uniforme, amorfo, destituído de água livre e com alta solubilidade. A ACP® apresenta estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, além de superar qualquer outra tecnologia de conservação, pois mantém as propriedades inerentes do produto original (GALIZA, 2004).

2.2 PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS POR FERMENTAÇÃO

A fermentação é uma das mais antigas tecnologias de preservação de alimentos. É um meio eficiente e barato de manter as qualidades nutricionais de matérias-primas perecíveis. Conforme mostrado na figura 6, a produção de alimentos fermentados é uma técnica utilizada há milhares de anos, (BATTCOCK e AZAM-ALI, 1998; ROSS, MORGAN e HILL, 2002).

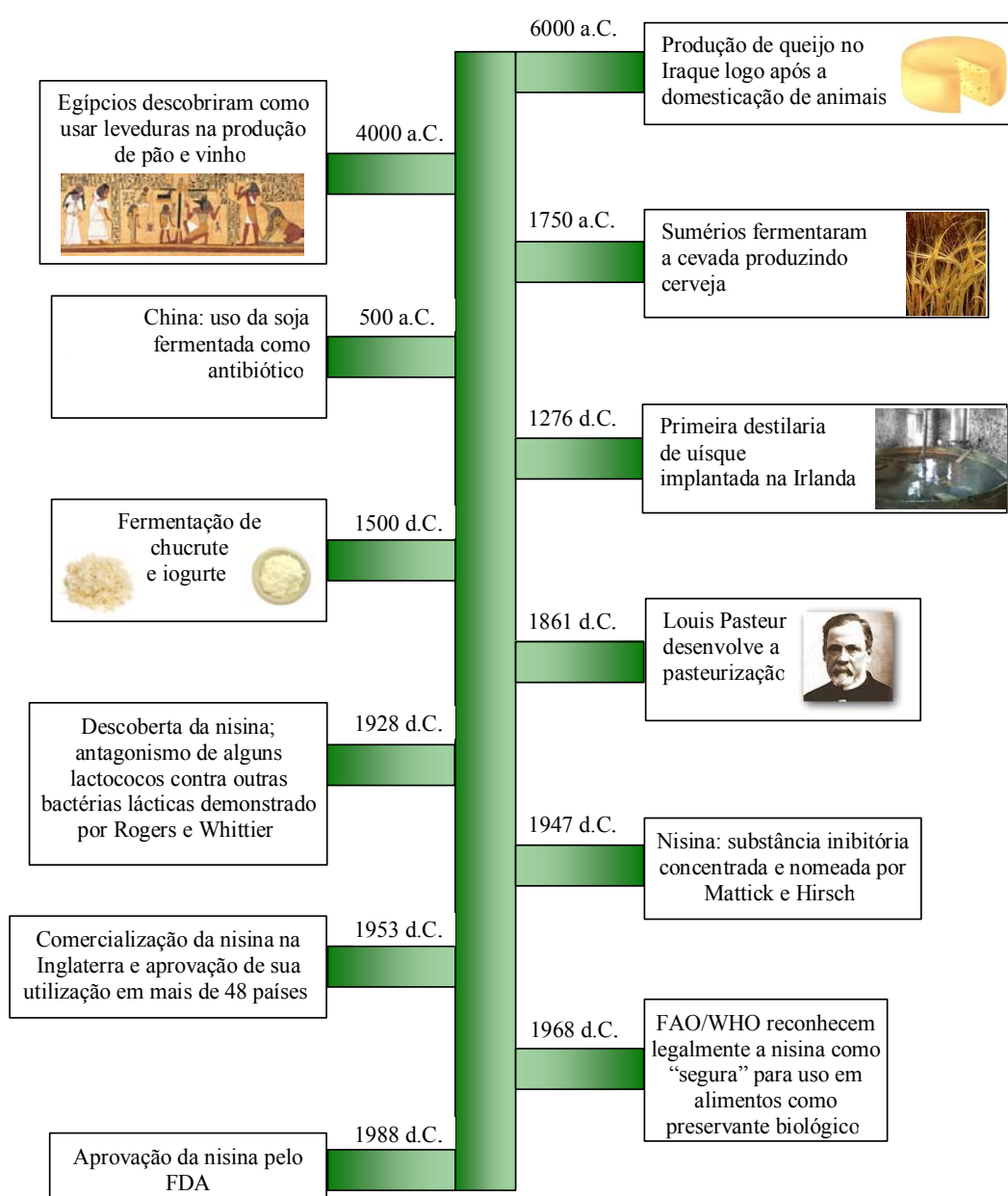
A fabricação de queijos, por exemplo, teve início no Iraque há mais de 8000 anos, justamente no mesmo período em que os animais começaram a ser domesticados (FOX, 1993). Mais tarde, no período entre 4000 e 2000 a.C., começaram a ser desenvolvidas fermentações alcoólicas para produção de vinho e cerveja por Egípcios e Sumérios. Os Egípcios também desenvolveram fermentação de massas para produção de pão levedado. Embora a preservação de alimentos e bebidas por fermentação tenha iniciado há muitos anos, os microrganismos foram reconhecidos como os responsáveis pelos processos fermentativos somente há poucas décadas.

A pasteurização teve início em 1861 e, pela primeira vez, foi reconhecida a principal função dos microrganismos nos processos de fermentação. Neste mesmo período acontecia a revolução industrial e um aumento da concentração populacional em grandes cidades. Houve então um deslocamento considerável da produção de alimentos das comunidades locais para produção em larga escala, nas fábricas. Este fato conduziu ao desenvolvimento de processos de fermentação também em grande escala, para produção de alimentos fermentados e bebidas alcoólicas, utilizando os mais variados tipos de microrganismos, incluindo leveduras para produção de cervejas,

vinhos e bebidas destiladas, e bactérias lácticas para fermentação de produtos lácteos, vegetais e carnes (ROSS, MORGAN e HILL, 2002).

Diversos microrganismos são capazes de produzir substâncias protéicas denominadas bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos, os quais podem reduzir ou inibir o desenvolvimento da flora indesejável em produtos alimentares (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

FIGURA 6 – GRANDES EVENTOS RELACIONADOS À PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS AO LONGO DOS ANOS



FONTE: Adaptada de ROSS, MORGAN e HILL, 2002.

As primeiras observações que levaram à descoberta das bacteriocinas foram feitas por ROGERS e WHITTIER (1928) na Inglaterra, quando eles descobriram que certas cepas de *Lactococcus* apresentavam efeito inibitório contra outras bactérias lácticas. Pouco tempo depois, pesquisadores da Nova Zelândia observaram inibição similar em culturas utilizadas na fabricação de queijos. Como a cepa produtora da substância inibidora foi identificada como um streptococo láctico do grupo sorológico N, essa bacteriocina foi chamada de “nisina” ou substância inibitória do grupo N (MATTICK e HIRSCH, 1947). Desde que foi aprovada, em 1969 pelo “FAO/WHO Expert Committee on Food Additives”, a nisina tem sido utilizada como bioconservante de alimentos em mais de 48 países (ROSS, MORGAN e HILL, 2002).

O propósito inicial da fermentação de alimentos era de preservar os mesmos. Mas com o desenvolvimento de inúmeras tecnologias de preservação, as quais estão disponíveis e têm sido muito utilizadas, este objetivo já não é prioritário. Muitos alimentos fermentados são produzidos porque desenvolvem sabor, aroma e textura únicos, muito apreciados pelos consumidores. Mesmo nestes casos, as condições geradas pela fermentação devem assegurar estabilidade durante o armazenamento e segurança para os consumidores. Em muitas partes do mundo a fermentação de alimentos com o intuito de “preservação” ainda é essencial e realizada de forma artesanal (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

2.3 FERMENTAÇÃO LÁCTICA

A rigor, a definição química de “fermentação” é aplicada para descrever um processo estrito de fermentação anaeróbica. Hoje em dia, há um consenso geral de que o termo envolva processos aeróbicos e anaeróbicos de metabolismo de carboidratos (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

A fermentação láctica é característica de tecidos animais, de alguns protozoários, fungos e bactérias. Resulta da ação enzimática de bactérias lácticas sobre açúcares simples (hexoses) convertendo-os em ácido láctico (FERREIRA, 1987; STANIER *et al.*, 1976).

Muitos alimentos fermentados dependem de bactérias lácticas para mediar o processo fermentativo. Os produtos finais do metabolismo de carboidratos por estas bactérias contribuem não somente para a preservação como também determinam características únicas no alimento fermentado. A habilidade de controlar o crescimento de microrganismos nocivos que podem estar presentes no alimento é outra característica desejável. A fermentação láctica também aumenta o valor nutricional dos alimentos por aumentar a digestibilidade, como por exemplo, na fermentação do leite para produção de iogurte.

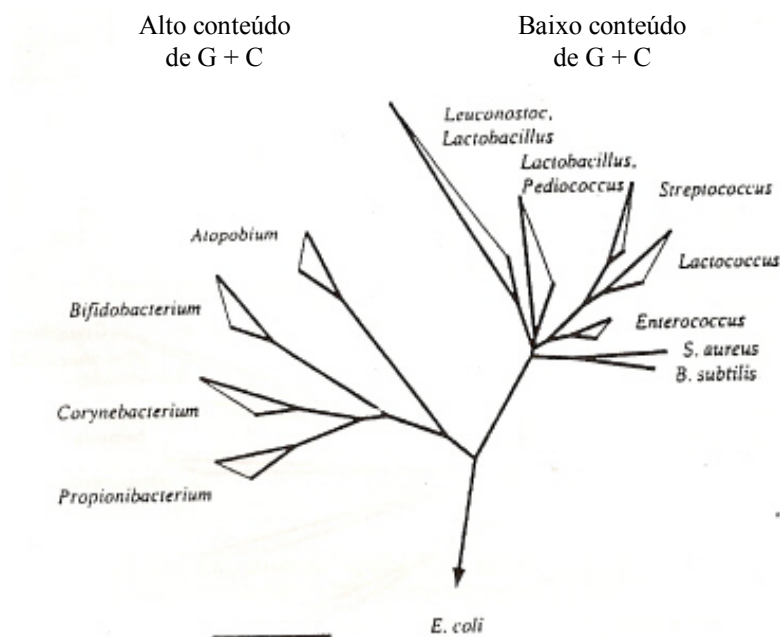
A funcionalidade dos alimentos fermentados parece ser um dos temas mais pesquisados na atualidade. Isto inclui não somente propriedades probióticas das bactérias lácticas, mas também se estende à geração dos componentes funcionais como vitaminas, antioxidantes e outros compostos presentes nos alimentos fermentados (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

2.3.1 Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas são as bactérias mais importantes presentes nos alimentos fermentados (BATTCOCK e AZAMALI, 1998). São células vivas, procariontes e heterotróficas, pois necessitam de fontes de carbono relativamente complexas (DELLAGLIO *et al.*, 1994). Pertencem a um grupo de bactérias Gram positivas, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, na forma de cocos ou bacilos, e que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos. Este grupo é composto de espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium*. São estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém, aerotolerantes, e geralmente são catalase-negativas (CONDON, 1987; DELLAGLIO *et al.*, 1994; SCHLEIFER e LUDWIG, 1995). Originalmente, o gênero *Bifidobacterium* era considerado um membro do grupo das bactérias lácticas, mas devido ao elevado conteúdo de G + C (guanina e citosina) no DNA e dados da subunidade 16S do RNA ribossomal, fica claro que espécies deste gênero pertencem ao ramo dos actinomicetes, conforme se observa na figura 7. Contudo, o termo “bactérias lácticas” pode

referenciar gêneros importantes como *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Atopobium* e *Probionibacterium* (SCHLEIFER e LUDWIG, 1995).

FIGURA 7 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS



FONTE: SCHLEIFER e LUDWIG, 1995.

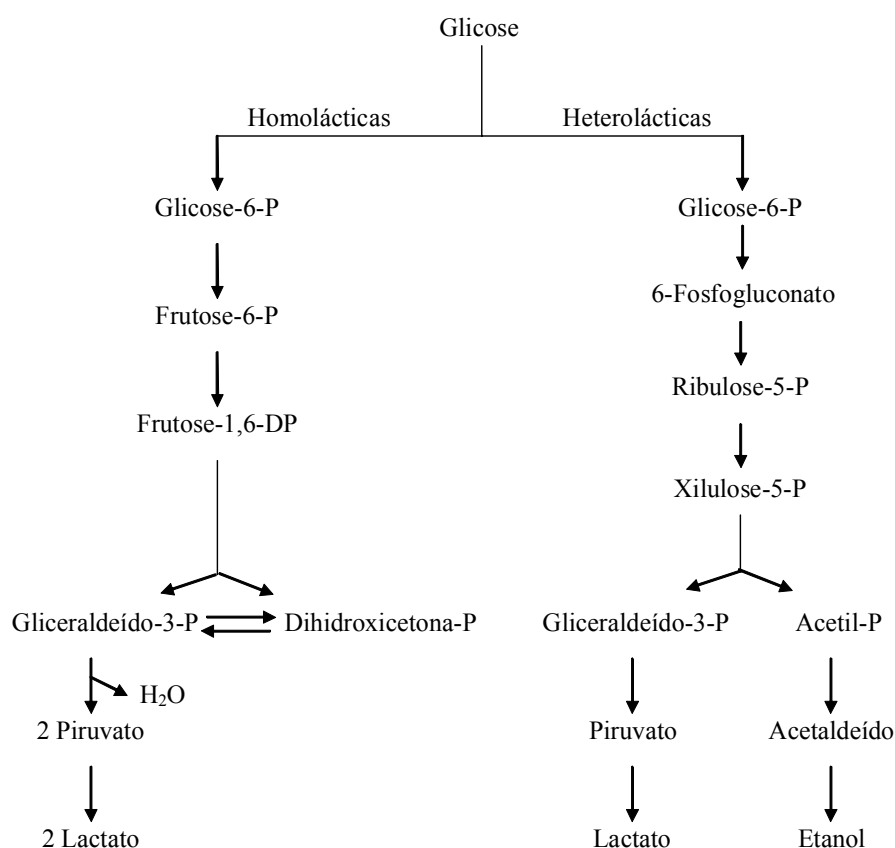
NOTA: a barra indica 10% de divergência no sequenciamento.

Geralmente as bactérias lácticas são mesófilas mas podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 5 °C ou tão altas quanto 45 °C. Enquanto a maioria das cepas cresce bem em pH 4,0-4,5, algumas se mantêm ativas em pH tão elevado quanto 9,6 ou tão baixo quanto 3,2. Todas as bactérias lácticas produzem ácido láctico a partir de hexoses. O ácido láctico produzido pode ser L (+), com menos frequência, D (-), ou ainda uma mistura de ambos (ROSS, MORGAN e HILL, 2002).

Por definição, bactérias lácticas são as bactérias que fermentam açúcares predominantemente a ácido láctico. Em relação ao metabolismo de carboidratos, podem ser divididas em dois grupos distintos, conforme a figura 8. As homolácticas, incluindo *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, as quais usam a via glicolítica (Emben-Meyerhof-Parnas) para

converter 1 mol de glicose em 2 mols de lactato; e as bactérias heteroláticas, que produzem quantidades equimolares de lactato, CO₂ e etanol a partir da glicose, usando a via das pentoses ou via da hexose monofosfato. Fazem parte deste grupo o gênero *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; ROSS, MORGAN e HILL, 2002).

FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DA FERMENTAÇÃO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS



FONTE: Adaptado de CAPLICE e FITZGERALD, 1999.

2.3.1.1 Identificação de bactérias lácticas

Devido à vasta utilização em alimentos fermentados e suplementos alimentares, as bactérias lácticas têm sido caracterizadas com relação a diversos aspectos importantes, como por exemplo suas propriedades metabólicas, perfil de crescimento, resistência a processos industriais, manutenção da viabilidade no produto

final e durante a vida-de-prateleira. Além dos aspectos tecnológicos, a questão da segurança e do controle de qualidade é crucial. Sendo assim, a correta identificação de bactérias lácticas usadas para consumo humano é extremamente importante (HAMILTON-MILLER *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000).

Na identificação de bactérias lácticas podem ser utilizados métodos fenotípicos ou genotípicos. Em geral os primeiros são mais baratos, o que estimula a utilização de sistemas de identificação miniaturizados como API (BioMérieux) ou BIOLOG. Apesar dos métodos fenotípicos serem úteis na identificação de certas bactérias lácticas, seus resultados nem sempre correspondem àqueles fornecidos pelos métodos genotípicos de identificação. Nas duas últimas décadas, tem-se acompanhado o intenso desenvolvimento de métodos de detecção e identificação com base no DNA. Uma das principais vantagens destes métodos é sua independência das variações observadas nas condições de crescimento dos microrganismos. Muitos métodos genotípicos são baseados no princípio da PCR (reação em cadeia da polimerase), a qual permite a amplificação seletiva de fragmentos alvo do DNA através do uso de *primers* e sob condições controladas (TEMMERMAN *et al.*, 2004). A técnica de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) em conjunto com PCR tem sido aplicada com sucesso na identificação de muitos microrganismos em nível de espécie (KHALED *et al.*, 1997).

2.3.1.2 Gênero *Lactobacillus*

Espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam-se na forma de bacilos ou coco-bacilos, isolados ou em cadeias, com conteúdo de G + C geralmente inferior a 50% em mols. Requerem nutrientes complexos, são anaeróbicos ou aerotolerantes e acidofílicos, com um pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2. Crescem em um largo espectro de temperatura, de 2 a 53 °C. Lactobacilos são encontrados nos mais diversos habitats, tais como mucosas de humanos e animais (cavidade oral, intestino e vagina), em plantas ou material de origem vegetal, nas fezes e em substratos manipulados pelo homem como esgoto e alimentos fermentados. Fazem parte deste gênero 56 diferentes espécies que se dividem em três grandes grupos:

- grupo A: lactobacilos homofermentativos obrigatórios. Hexoses são quase exclusivamente (acima de 85%) fermentadas em ácido láctico pela via glicolítica. Estes microrganismos possuem frutose-1,6-difosfato-aldolase, mas não possuem fosfocetolase. Assim, não fermentam gluconato ou pentoses.
- grupo B: lactobacilos heterofermentativos facultativos. Hexoses são quase exclusivamente fermentadas em ácido láctico pela via glicolítica. Estes microrganismos possuem aldolase e fosfocetolase. Portanto, não fermentam apenas hexose, mas também pentoses, inclusive gluconato.
- grupo C: lactobacilos heterofermentativos obrigatórios. Hexoses são fermentadas pela via das pentoses formando lactato, etanol (ou ácido acético) e CO₂ em quantidades equimolares (DELLAGLIO *et al.*, 1994; HAMMES e VOGEL, 1995).

A letra “A” indica afiliação ao grupo dos *Lactobacillus delbrueckii*, “B” para o grupo dos *Lactobacillus casei* – *Pediococcus* e “C” para o grupo dos *Leuconostoc* (HAMMES e VOGEL, 1995).

A espécie *Lactobacillus plantarum* apresenta-se na forma de bacilos retos com extremidades arredondadas e tamanho variando de 0,9-1,2 µm de espessura por 3,0-8,0 µm de comprimento. As células apresentam-se sozinhas, em pares ou cadeias curtas. Algumas cepas reduzem nitratos e outras, ocasionalmente, exibem atividade de pseudocatalase, especialmente sob baixa disponibilidade de glicose. *Lactobacillus plantarum* necessitam pantotenato de cálcio e niacina para seu crescimento, mas não requerem tiamina, piridoxal ou piridoxamina, ácido fólico, vitamina B₁₂, timidina e desoxirriboses. Espécies de *Lactobacillus plantarum* foram isoladas de produtos lácteos, silagem, chucrute, pickles, esgoto e boca, trato intestinal e fezes de humanos (HAMMES e VOGEL, 1995).

A espécie *Lactobacillus paracasei* apresenta-se na forma de bacilos de tamanho variando de 0,8-1,0 µm de espessura por 2,0-4,0 µm de comprimento. As células se dispõem sozinhas ou em cadeias e podem crescer a 10 e a 40° C (HAMMES e VOGEL, 1995). São conhecidas duas subespécies: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*. Cepas de *Lactobacillus paracasei*

subsp. *paracasei* foram isoladas do homem, de produtos lácteos, de silagem e do esgoto (HAMMES e VOGEL, 1995).

2.3.1.3 Gênero *Bifidobacterium*

As bifidobactérias possuem uma variedade de formas diferentes como cocóides, alongadas com protuberâncias ou bifurcações. São anaeróbicas e não produtoras de gás. A maioria das bifidobactérias são catalase-negativas, com exceção da *B. indicum* e *B. asteroides* que são catalase-positivas quando cultivadas na presença de ar. Podem crescer numa faixa de temperatura que varia de 25 a 45 °C, mas sua temperatura ótima de crescimento é entre 37 e 41 °C. Seu pH ótimo de crescimento é de 6,5 a 7,0 e não crescem em pH 4,5-5,0 nem em pH 8,0-8,5. São encontradas no intestino humano, vagina, cavidade oral, intestino de animais e esgoto. Fermentam hexoses produzindo os ácidos acético e láctico na proporção de 3:2 sem produção de CO₂, exceto na degradação de gluconato. Pequenas quantidades de ácido fórmico, etanol e ácido succínico são produzidos, mas não há nenhuma produção de ácido butírico ou propiônico. A glicose é degradada exclusivamente e caracteristicamente pela via frutose-6-fosfoetolase, também conhecida com “via bífida”. O conteúdo de G + C no DNA varia de 55% a 67% em mols. As bifidobactérias fermentam vários tipos de açúcares; alguns como lactose, galactose e sacarose são metabolizados por várias espécies, enquanto outros como manitol e sorbitol são fermentados por um número restrito de espécies. São conhecidas 29 espécies diferentes de bifidobactérias. Com exceção da *B. dentium* que pode causar cárie dentária, todas as outras espécies têm um efeito benéfico mantendo o balanço da flora intestinal humana. Devido à ação terapêutica do grupo de bifidobactérias intestinais, as indústrias de alimentos e fármacos têm adicionado estas culturas ao leite e seus subprodutos, em particular o iogurte, e em preparações farmacêuticas. As espécies mais utilizadas são *B. bifidum*, *B. longum* e *B. breve*, frequentemente combinadas com culturas de *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* para facilitar a acidificação (DELLAGLIO *et al.*, 1994; SGORBATI, BIAVATI e PALENZONA, 1995).

Cepas de *Bifidobacterium animalis* apresentam características típicas do gênero *Bifidobacterium*. Sua temperatura ótima de crescimento é de 39-41 °C. Não crescem em meio incubado na presença de ar, mesmo quando enriquecido com CO₂. Os ácidos láctico e acético são produzidos na razão molar de 1:3,6. As cepas de *Bifidobacterium animalis* foram originariamente isoladas de fezes de ratos. O conteúdo de G + C no DNA é de 61,3 mol% (MASCO *et al.*, 2004). São conhecidas duas subespécies: *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Esta última é muito utilizada como probiótico em produtos lácteos ou como suplemento em fórmulas infantis. A cepa *Bifidobacterium lactis* foi previamente descrita e caracterizada pela sua elevada resistência ao oxigênio e produção de consideráveis quantidades de ácido fórmico (MEILE *et al.*, 1997). Devido ao grande interesse na aplicação desta cultura em produtos probióticos é que foram desenvolvidas técnicas de identificação molecular que propuseram a reclassificação do *Bifidobacterium lactis* como uma subespécie do *Bifidobacterium animalis* (VENTURA e ZINK, 2002).

Cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* apresentam temperatura ótima de crescimento de 39-42 °C. Não crescem em placas expostas ao ar, mas toleram a presença de 10% de oxigênio na atmosfera existente sobre o meio líquido. Crescem em leite ou em meios à base de leite. A razão molar de ácido acético e láctico provenientes do metabolismo da glicose é de aproximadamente 10:1 em condições anaeróbicas. Já foram isoladas de amostras de leite fermentado, fezes de crianças, coelhos e galinhas e esgoto. O conteúdo de G + C no DNA é de 61 mol% (MASCO *et al.*, 2004).

2.3.1.4 Compostos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas

A ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos ou seus produtos pode causar um grande número de enfermidades. A intoxicação alimentar microbiana, por exemplo, é uma patologia de caráter agudo, caracterizada por gastroenterite, onde os sintomas mais comuns são diarreia, vômito e dor abdominal.

As características básicas de algumas bactérias patogênicas importantes, causadoras de intoxicações alimentares, estão dispostas na tabela 2 (ELEY, 1992).

A ausência de bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, por exemplo, estão relacionados à inocuidade de produtos lácteos (HERREROS *et al.*, 2005).

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANTES BACTÉRIAS PATOGÊNICAS COMUMENTE ENCONTRADAS EM ALIMENTOS

Espécie	Coloração de Gram	Morfologia celular	Catalase
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Cocos	-
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilos	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Bacilos	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Bacilos	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	Bacilos	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Cocos	+

FONTES: ELEY, 1992; TODAR, 2005

A ação preservativa de algumas cepas de microrganismos em alimentos e bebidas é atribuída à ação combinada de uma variedade de metabólitos produzidos durante a fermentação (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Em cada caso, o processo fermentativo envolve a oxidação de carboidratos para geração de produtos. No caso das bactérias lácticas são produzidos principalmente ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e peptídeos bioativos (RAY, 1992; HERREROS *et al.*, 2005). Outros produtos desejáveis, os quais afetam a qualidade dos produtos alimentícios, podem ser produzidos, incluindo compostos aromatizantes como diacetil e acetaldeído, assim como compostos que podem ter efeito positivo na saúde como vitaminas e antioxidantes. Estes produtos têm um efeito preservativo sobre os alimentos, limitando o crescimento de esporulados e/ou da flora patogênica (ROSS, MORGAN e HILL, 2002). Cada composto antimicrobiano produzido durante a fermentação fornece um obstáculo adicional a ser superado por bactérias patogênicas ou esporulados antes de sua sobrevivência e/ou proliferação em um alimento ou bebida (ROSS, MORGAN e HILL, 2002).

Ácidos orgânicos como o láctico, o acético e o propiônico exercem seu efeito antimicrobiano interferindo na manutenção do potencial da membrana celular, inibição do transporte ativo, redução intracelular do pH e inibição de uma variedade de funções metabólicas (DOORES, 1993). A forma não dissociada do ácido orgânico entra na célula bacteriana e se dissocia no citoplasma. A eventual queda do pH intracelular ou o acúmulo intracelular da forma ionizada do ácido orgânico leva à morte do patógeno (RUSSEL e DIEZ-GONZALEZ, 1998).

A ação bactericida do peróxido de hidrogênio é atribuída a seu forte efeito oxidante sobre a membrana de lipídeos e proteínas celulares. As bactérias lácticas produzem o peróxido como mecanismo de proteção frente ao oxigênio, pela ação das oxidases ou NADH peroxidases (CONDON, 1987). O acúmulo de peróxido de hidrogênio nos produtos fermentados ocorre porque os *Lactobacillus* não possuem a enzima catalase (DAESCHEL, 1989).

Sabe-se ainda que muitas bactérias lácticas produzem proteínas inibitórias conhecidas como bacteriocinas. Estes compostos geralmente atuam através da despolarização da membrana celular alvo ou pela inibição da síntese da parede celular (ABEE *et al.*, 1995). As bacteriocinas variam na sua especificidade desde um estreito espectro de atividade como, por exemplo, as lactococinas que inibem somente lactococos, até compostos com ampla atividade, como a nisina (JACK, TAGG e RAY, 1995). As principais espécies produtoras de bacteriocinas são *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pc. damnosus* e *Leuconostoc mesenteroides* (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

2.3.1.5 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas

Na indústria de alimentos, os exopolissacarídeos (EPSs) de origem microbiana são largamente aplicados como agentes espessantes, geleificantes e estabilizantes. Tem se observado crescente interesse no uso de EPSs produzidos por bactérias lácticas principalmente pelo fato das mesmas serem consideradas GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para aplicação em alimentos (ROBIJN *et al.*, 1996).

Os EPSs produzidos por bactérias lácticas são muito utilizados na fabricação de leites fermentados devido às propriedades reológicas e à textura que proporcionam a esses produtos. Outro fato importante é que os EPSs podem apresentar efeito antitumoral e têm sido alvo de vários estudos nos últimos anos (CERNING, 1994).

ROBIJN *et al.* (1996) estudaram a estrutura do EPS produzido por *Lactobacillus paracasei* 34-1 em um meio de cultivo semi-definido. O polissacarídeo é um heteropolímero, composto de D-galactose, 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose e *sn*-glicerol 3-fostato em quantidades molares de 3:1:1.

2.3.2 Influência de Fatores Ambientais na Fermentação Láctica

Vários estudos têm mostrado a influência do pH no metabolismo das bactérias lácticas. O pH pode afetar diretamente o padrão fermentativo das bactérias lácticas e varia com a espécie. Por exemplo, o *L. bulgaricus* é homofermentativo em condições ácidas, mas torna-se heterofermentativo em condições alcalinas (RHEE e PACH, 1980). Por outro lado, o *L. plantarum* produz mais ácido láctico e menos acetoina em altos valores de pH (TSENG e MONTVILLE, 1990), enquanto o *L. manihotivorans* produz mais ácido láctico a partir de amido quando o pH é controlado em 6,0 (GUYOT *et al.*, 2000). Assim, a rota homo ou heterofermentativa das bactérias lácticas pode ser alterada por mudanças no pH do meio (LIU, 2003).

Geralmente as bactérias lácticas são aerotolerantes, mas a presença de oxigênio pode afetar sua fisiologia e metabolismo. Bactérias heterofermentativas produzem mais acetato e menos etanol durante o crescimento em condições aeróbicas, embora a produção de lactato não seja afetada. O mesmo ocorre com bactérias homofermentativas, mas nesse caso a produção de ácido láctico é diminuída (LIU, 2003). Entre as *Bifidobactérias*, a *B. lactis* é a espécie mais tolerante ao oxigênio, sendo apta a crescer em meio líquido com até 10% de oxigênio presente no *headspace* (MEILE *et al.*, 1993).

A concentração de substrato tem impacto significativo no metabolismo das bactérias lácticas. Por exemplo, quando a concentração de glicose é limitada, *Lactococcus lactis* torna-se heterofermentativo produzindo uma mistura de metabólitos: ácido acético, fórmico, láctico e etanol (THOMAS *et al.*, 1979). No caso

do *L. casei* resultados semelhantes são observados. Esta bactéria converte glicose em concentração limitada a ácido acético, fórmico e etanol. Já em concentração não limitada, a glicose é fermentada predominantemente a ácido láctico (DE VRIES *et al.*, 1970). O tipo de substrato também influencia no metabolismo das bactérias lácticas. Embora as cepas de *Lactococcus lactis* geralmente fermentem glicose predominantemente a lactato, muitas delas fermentam galactose a lactato, acetato e formiato (THOMAS *et al.*, 1980). Além disso, uma cepa de *Lc. Lactis* mostrou-se homofermentativa em presença de glicose, mas heterofermentativa com maltose, o que pôde ter ocorrido devido a diferença na utilização das duas fontes de carbono para obter energia durante o metabolismo (SJÖBERG e HAHAN-HÄGERDAL, 1989).

O impacto da temperatura e NaCl no metabolismo das bactérias lácticas é menos estudado. Uma cepa de *L. rhamnosus* produziu mais ácido láctico a 45 °C e menos a 37 °C enquanto a produção de acetoina e diacetil foi maior a 37 °C do que a 45 °C (DE FIGUEROA *et al.*, 2001). A presença de 6% (p/v) de NaCl não afetou a produção de acetato e lactato em pH 5,0, mas inibiu a formação de acetato em pH 4,5 pelo *L. plantarum* (BOBILLO e MARSHALL, 1992). Muitas cepas de *L. sakei*, espécie conhecida por produzir a mistura racêmica de ácido láctico, substituíram a produção de DL-lactato por L(+)-lactato na presença de acetato de sódio 50 mM (LINO *et al.*, 2001).

2.3.3 Culturas Mistas na Fermentação Láctica

O uso de *Bifidobacterium* spp. e/ou *Lactobacillus acidophilus* em leites fermentados tornou-se popular no final da década de 70, como resultado dos avanços científicos na área de taxonomia e ecologia das bifidobactérias. Sua popularidade também aumentou devido à sua característica de baixa capacidade de acidificação durante a estocagem (GOMES e MALCATA, 1999). O uso concomitante de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em bebidas lácteas, por exemplo, oferece vantagens ao consumidor por fornecer um produto de aroma mais suave e menor acidez em relação ao iogurte tradicional (KLAVER *et al.*, 1993; SAMONA e ROBINSON, 1994). As bifidobactérias contribuem para a formação de um produto de maior

aceitabilidade, menor sabor ácido ou amargo e menor acidificação durante a estocagem (MEDINA e JORDANO, 1994).

O uso de culturas mistas de *B. longum* e *L. acidophilus* na fermentação do leite desnatado foi estudado. Em comparação com as culturas puras, o uso de culturas mistas reduziu o tempo de fermentação (HADADJI e BENSOLTANE, 2006).

O consumo de produtos contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum* tem a potencialidade de melhorar os movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes, prevenindo ou controlando infecções intestinais, bloqueando os receptores dos patógenos, inativando os efeitos das enterotoxinas e favorecendo o desenvolvimento de microrganismos resistentes a patógenos, especialmente contra *Escherichia coli* (LEE *et al.*, 1999).

2.4 PROBIÓTICOS

A palavra probióticos vem do grego “pro bios” que significa “para a vida”. A história dos probióticos iniciou com a história do homem; o queijo e o leite fermentado eram bem conhecidos pelos Gregos e Romanos que recomendavam seu consumo, especialmente para crianças e convalescentes (GISMONDO *et al.*, 1999). A primeira associação dos probióticos com os benefícios à saúde foi feita em 1908 quando o cientista russo Eli Metchnikoff associou a longevidade de camponeses búlgaros ao consumo de produtos lácteos fermentados. Ao longo das duas últimas décadas, muita atenção tem sido dada às funções microbianas que afetam a saúde e a nutrição do hospedeiro. A difusão da resistência aos antibióticos tem renovado o interesse tanto em médicos quanto em cientistas no uso de probióticos e tem levado a descobrir que alguns microrganismos são capazes de proteger o trato gastrointestinal da invasão por patogênicos ou bactérias oportunistas (GISMONDO *et al.*, 1999; FIORAMONTI *et al.*, 2003).

2.4.1 Definição de Probiótico

O termo “probiótico” foi usado pela primeira vez por LILLY e STILLWELL em 1965 para descrever “compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano”. Posteriormente, PARKER (1974) definiu probióticos como “organismos e substâncias que contribuem para o balanço da microflora intestinal” e FULLER (1989) definiu como “suplemento alimentar com microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço da sua flora intestinal”. Essas definições eram pouco satisfatórias, pois a palavra “substância” poderia incluir antibióticos, cuja função é oposta.

Nas definições mais modernas, o conceito de “ação na microflora intestinal” desapareceu. SALMINEN *et al.* (1998) definiram probióticos como “microrganismos viáveis (bactérias ou leveduras) que exibem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro quando ingeridos”. Recentemente, o termo “probiótico” foi definido por um Comitê Internacional como “microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinada quantidade, exercem efeitos benéficos à saúde além da nutrição geral inerente” (GUARNER e SCHAAFSMA, 1998; FAO/WHO, 2001). Isto significa que os microrganismos devem estar vivos e presentes em grande quantidade, geralmente acima de um bilhão por dose diária ingerida (GORBACH, 2002).

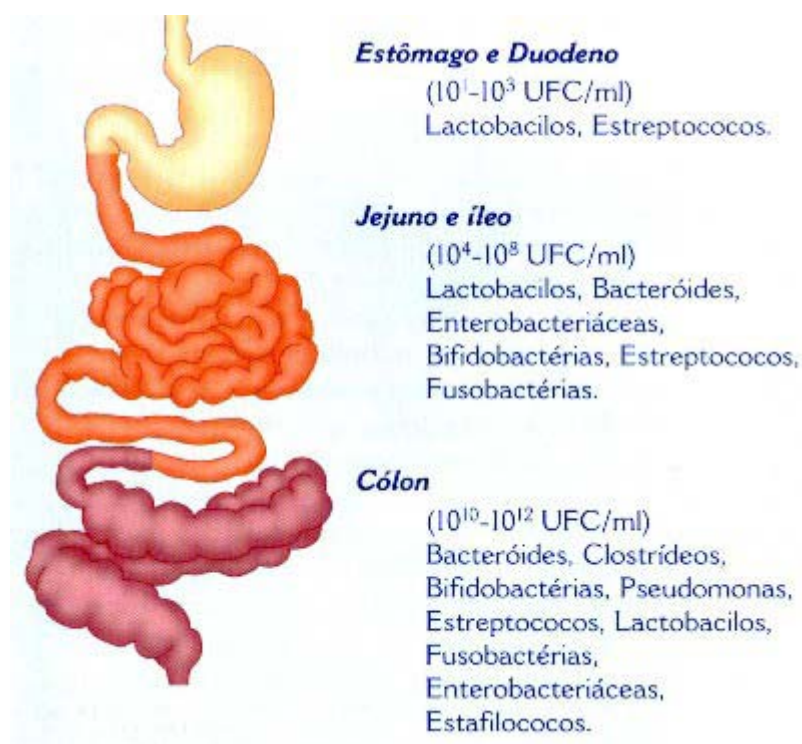
2.4.2 Efeitos Benéficos dos Probióticos

As bactérias probióticas, especificamente bifidobactérias e lactobacilos, normalmente habitam o cólon humano. Estas bactérias afetam benéficamente a saúde humana por melhorar o balanço da microbiota intestinal e as defesas da mucosa intestinal contra microrganismos patogênicos (BOYLSTON *et al.*, 2004).

O termo microbiota refere-se ao conjunto de bactérias que reside normalmente no intestino do homem. Essa microbiota começa a se formar ainda durante o parto, adquire suas características principais próximo aos dois anos de idade e, a partir de então, acompanha o homem pelo resto de sua vida. A composição exata desta microbiota ainda é bastante desconhecida, calcula-se que pelo menos 40% das suas

espécies ainda não foram isoladas. As bactérias da flora intestinal são encontradas nas duas porções do intestino, o delgado e grosso (figura 9), sendo este o mais densamente colonizado (TRABULSI e CARNEIRO-SAMPAIO, 2000).

FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO TRATO GASTRINTESTINAL



FONTE: TRABULSI e CARNEIRO-SAMPAIO, 2000.

A concentração de bactérias no intestino delgado proximal é da ordem 10^3 UFC/mL, sendo as espécies mais representativas, os estafilococos, streptococos e lactobacilos. Raramente são encontradas bactérias anaeróbias. No íleo distal, o número de bactérias já é bem maior (10^8 UFC/mL) e a flora torna-se bastante diversificada, passando a abranger coliformes e várias espécies de bactérias anaeróbias como bacteróides, fusobactérias e clostrídeos. Depois da válvula íleocecal, a concentração bacteriana atinge 10^{10} - 10^{12} UFC/mL. No intestino grosso predominam os bacteróides, bifidobactérias, fusobactérias, lactobacilos, streptococos e clostrídeos. Calcula-se que

a flora intestinal possua próximo de 200 espécies bacterianas diferentes, mas somente 20 são representados de maneira significativa (TRABULSI e CARNEIRO-SAMPAIO, 2000).

Existe um delicado balanço entre a microbiota intestinal humana e seu hospedeiro. O desequilíbrio desta estrutura pode desencadear sintomas de gastroenterite aguda, ou mesmo doenças crônicas como doença inflamatória intestinal e câncer de cólon. Por isso é tão importante que as interações da microbiota intestinal sejam controladas e mantidas em equilíbrio. Diversos fatores ambientais podem afetar a ecologia microbiana intestinal, incluindo a dieta, medicamentos, estresse, idade e até mesmo o modo de vida (GIBSON e FULLER, 2000).

Propiciar o equilíbrio da microbiota intestinal talvez seja o principal efeito dos probióticos, mas há vários outros efeitos relacionados à melhora na saúde e que são associados ao uso de probióticos:

- prevenção de diarreias causadas por bactérias e vírus patogênicos;
- atividade contra infecções e complicações causadas pelo *Helicobacter pylori*, causador da gastrite tipo B, úlceras pépticas e câncer gástrico;
- prevenção de doenças inflamatórias e síndromes do intestino;
- prevenção de câncer de cólon;
- ativação do sistema imunológico;
- prevenção de doenças alérgicas;
- prevenção e terapia de doenças cardiovasculares;
- redução de doenças do trato urogenital (FAO/WHO, 2001).

Estudos clínicos têm mostrado que a maioria dos desarranjos digestivos está associada a alterações na permeabilidade intestinal. Pesquisas mostraram que a colonização do intestino de ratos com *Escherichia coli* aumentou a permeabilidade celular, enquanto uma redução foi observada após colonização com *Lactobacillus brevis*. Concluiu-se, portanto, que estas alterações na permeabilidade celular podem estar associadas com a adesão das bactérias à mucosa intestinal. No homem, o aspecto mais estudado a respeito da ação dos probióticos na digestão é sua compensação nos casos de insuficiência de lactase. Como os probióticos apresentam efeito positivo no

tratamento de diarreias, sugere-se que eles estimulam a absorção de água e eletrólitos (FIORAMONTI *et al.*, 2003). Alguns dados indicaram que microrganismos probióticos são capazes de modificar o trânsito intestinal. Em voluntários selecionados, que apresentavam um tempo total de trânsito intestinal superior a 40 horas, o consumo regular de leite fermentado com *Bifidobacterium animalis* acelerou bastante o trânsito intestinal destes indivíduos (MEANCE *et al.*, 2001).

Talvez um dos efeitos mais interessantes seja a atividade anticancerígena dos probióticos. A grande maioria dos estudos nesta área é relacionada aos efeitos de proteção contra o câncer de cólon que é o segundo colocado em casos de mortalidade, perdendo para o câncer de pulmão nos homens e câncer de mama nas mulheres. Mais de 75% dos casos de câncer de cólon estão associados à dieta alimentar. Alguns dos mecanismos pelos quais os probióticos podem inibir o câncer de cólon são:

- alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal;
- alteração das condições físico-químicas do cólon;
- degradação de compostos carcinogênicos;
- produção de compostos antitumorais;
- aumento da imunidade e efeitos na fisiologia do hospedeiro (RAFTER, 2003).

2.4.3 Características Essenciais dos Probióticos

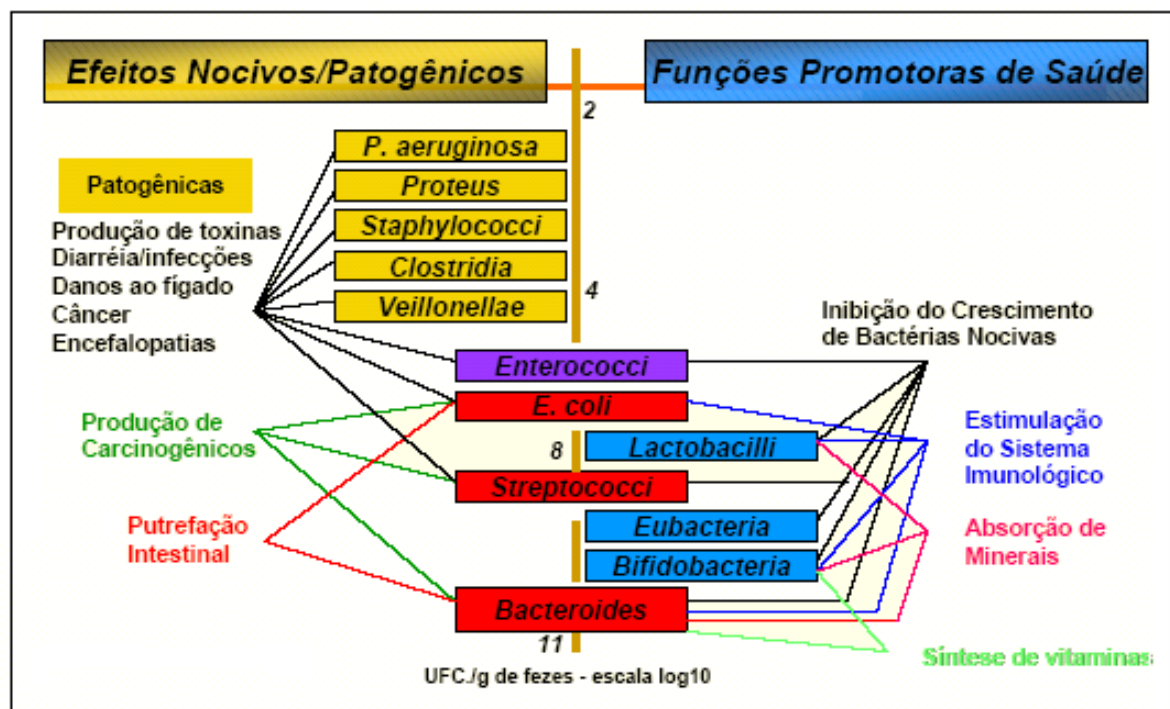
De acordo com GISMONDO *et al.* (1999) e FIORAMONTI *et al.* (2003), os microrganismos probióticos devem apresentar as seguintes características essenciais:

- segurança total para o hospedeiro;
- aderência às células epiteliais do intestino;
- resistência ao ácido gástrico e às secreções pancreáticas;
- atividade antimicrobiana;
- inibir a adesão de bactérias patogênicas;
- resistência aos antibióticos;
- tolerância aos aditivos alimentares;
- estabilidade no alimento processado.

A aderência às células intestinais é a primeira etapa no mecanismo de ação do probiótico. De fato, os microrganismos probióticos são testados quanto à sua habilidade de colonizar o epitélio intestinal e, embora o mecanismo molecular de adesão não seja compreendido, as células bacterianas hidrofóbicas são eficientes na adesão nas superfícies dos tecidos. A capacidade de colonização é muito importante porque as bactérias ingeridas na forma de produtos probióticos podem multiplicar-se e colonizar o intestino. Porém, para alcançar e colonizar o intestino, a bactéria tem que ser resistente ao pH ácido e aos sais biliares (GISMONDO *et al.*, 1999).

É de extrema importância a realização de estudos toxicológicos de curta ou longa duração para que cepas utilizadas como probiótico sejam seguras. Espécies do gênero *Lactococcus* e *Lactobacillus* são classificadas como GRAS enquanto espécies do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* e algumas bactérias lácticas apresentam algumas características patogênicas (SALMINEN *et al.*, 1998).

FIGURA 10 – PATOGENICIDADE DOS MICRORGANISMOS QUE FAZEM PARTE DA MICROBIOTA INTESTINAL



FONTE: GIBSON e COLLINS, 1998.

De acordo com a figura 10, a microbiota intestinal pode ser dividida em três grupos. Um é regularmente benéfico, outro pode ser benéfico ou não, e o terceiro é nocivo à saúde humana. Pertencem ao primeiro grupo os lactobacilos, estreptococos lácticos e as bifidobactérias. São várias as evidências que demonstram que essas bactérias colaboram para o bem-estar do homem através de vários mecanismos, tais como aumento da resistência à colonização de patógenos, ativação do sistema imunológico, produção de vitaminas, inativação de substâncias cancerígenas e transformação de colesterol ao nível da mucosa intestinal. Pertencem ao segundo grupo as enterobactérias e os enterococos que, embora causem infecções extra-intestinais, freqüentemente favorecem o aumento de nossas defesas imunológicas. O terceiro grupo de bactérias nocivas poderia ser representado pelos clostrídeos e pelas bactérias sulforredutoras que produzem toxinas e H_2S tóxico, respectivamente (TRABULSI e CARNEIRO-SAMPAIO, 2000). Nenhum efeito prejudicial foi observado em estudos clínicos com lactobacilos e bifidobactérias. A degradação da mucosa intestinal tem sido usada como o primeiro sinalizador da toxicidade. Estudos recentes mostraram que os probióticos comercializados são inativos na degradação da mucosa (SALMINEN *et al.*, 1998).

Inúmeros estudos têm como objetivo a obtenção de novas cepas de probióticos que sejam mais ativas. No caso de novos microrganismos ou organismos geneticamente modificados, a questão da segurança e a razão risco/benefício devem ser cuidadosamente avaliadas (SALMINEN *et al.*, 1998).

2.4.4 Espécies Microbianas mais Utilizadas como Probióticos

Microrganismos probióticos geralmente consistem de espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas não se restringem a estas, como pode ser observado na tabela 3 (FAO/WHO, 2001; GORBACH, 2002).

Lactobacillus e *Bifidobacterium* são resistentes ao ácido gástrico, sais biliares e enzimas pancreáticas e se aderem à mucosa colonizando rapidamente o trato intestinal. Estudos *in vitro* mostraram que as bactérias lácticas inibem o crescimento de muitos patógenos entéricos, incluindo *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* (FIORAMONTI *et al.*, 2003).

TABELA 3 – ESPÉCIES MICROBIANAS MAIS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS

Gênero <i>Lactobacillus</i>	Gênero <i>Bifidobacterium</i>	Outros Gêneros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>L. casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. lactis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

FONTES: O'SULLIVAN *et al.*, 1992; COLLINS, THORNTON e O'SULLIVAN, 1998; GORBACH, 2002; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002.

Algumas das espécies apresentadas, cuja ação probiótica está cientificamente comprovada, estão disponíveis no mercado. A tabela 4 apresenta espécies utilizadas comercialmente em diferentes produtos probióticos.

TABELA 4 – MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS

Origem	Culturas	Origem	Culturas
Yakult, Japão	<i>L. casei</i> Shirota	Nestlé, Suíça	<i>L. acidophilus</i> LA10 (NCC 90)
Gynelogix, EUA	<i>L. crispatus</i> CTV05	Urex, Canadá	<i>L. johnsonii</i> LA1 (NCC 533)
BioGaia, Suécia	<i>L. reuteri</i> MM53		<i>L. fermentum</i> RC-14
Valio, Finlândia	<i>L. rhamnosus</i> GG	Danone, França	<i>L. rhamnosus</i> GR-1
Danisco, França	<i>B. lactis</i> HN019	Probi AB, Suécia	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DN-173 010
Rhodia, EUA	<i>L. acidophilus</i> NCFM		<i>L. casei</i> DN-114 001
	<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	Chr. Hansen, EUA	<i>L. plantarum</i> 299v
			<i>L. rhamnosus</i> 271
			<i>L. acidophilus</i> LA-5
			<i>B. lactis</i> BB-12
			<i>L. casei</i> CRL 431
			<i>L. bulgaricus</i> LBY27
			<i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31

FONTE: PRADO *et al.*, 2007.

2.4.5 Produtos Probióticos

Existe um volume considerável de recursos na comercialização de probióticos para aplicação em seres humanos, tanto na Europa, Estados Unidos e Japão, como em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Estes produtos probióticos podem conter um único microrganismo ou uma combinação de várias cepas. São vendidos como alimentos fermentados (iogurtes e leites fermentados), suplementos alimentares ou preparações farmacêuticas. O quadro 1 mostra alguns produtos alimentícios e farmacêuticos comercializados no Brasil que contêm probióticos.

Grandes empresas como a Danone, por exemplo, já chegou a faturar só no Brasil 1 bilhão de reais em 2003 com a venda de produtos lácteos probióticos. Neste mesmo ano o consumo de iogurte também cresceu 25% no país, passando de 3 para 4 kg/pessoa/ano (JÚLIO, 2003).

Probióticos com boas propriedades tecnológicas devem apresentar um bom crescimento no meio de cultivo de interesse, promover propriedades sensoriais adequadas no produto final e serem estáveis e viáveis durante o período de armazenamento. Assim, podem ser manipulados e incorporados em produtos alimentícios sem perder a funcionalidade e resultando em produtos com propriedades sensoriais adequadas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Para que os probióticos apresentem efeito terapêutico, a indústria de alimentos recomenda a ingestão diária de pelo menos 10^9 células viáveis ou 100 g de um produto contendo 10^7 células viáveis por grama do produto ingerido. Embora seja dada uma maior atenção ao uso de leites fermentados e iogurtes como veículo para o consumo de probióticos, estes produtos reduzem a viabilidade de algumas cepas, especialmente de bifidobactérias, devido à elevada acidez. Vários estudos mostraram avanços tecnológicos na incorporação de bifidobactérias em queijos. O ambiente típico de muitos iogurtes e produtos lácteos fermentados, incluindo baixo pH e condições aeróbicas de produção e embalagem, pode resultar numa redução da contagem de bifidobactérias, e, conseqüentemente, redução da ação terapêutica dos probióticos. Uma das maiores limitações da incorporação de bifidobactérias nos iogurtes é o pH do produto (3,7 – 4,3), sendo que o pH ótimo para as bifidobactérias é 6,5 - 7,0, tendo seu

crescimento inibido em valores abaixo de 5,0. Os queijos apresentam um pH superior ao dos leites fermentados (4,8 – 5,6). Além disso, a matriz dos queijos e seu elevado conteúdo de gordura oferecem proteção às bactérias probióticas durante a passagem através do trato gastrointestinal (BOYLSTON *et al.*, 2004).

QUADRO 1 – PRODUTOS PROBIÓTICOS ALIMENTÍCIOS E FARMACÊUTICOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Produto	Fabricante	Probióticos	Funções atribuídas
Leite fermentado Yakult	Yakult	<i>L. casei</i> Shirota	Normalizar o equilíbrio da microbiota intestinal humana
Leite fermentado Chamyto	Nestlé	<i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i>	-
Leite fermentado Parmalat	Parmalat	<i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	-
Leite fermentado Vigor Club	Vigor	<i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i>	-
Leite fermentado Batavito	Batavo	<i>L. casei</i>	-
Leite fermentado LC1 Active	Nestlé	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> NCC 208	Prevenir a instalação de bactérias nocivas na parede do intestino; estimular as células do sistema imunológico, aumentado os anticorpos
Iogurte Biofibras	Batavo	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	-
Iogurte Dietalat	Parmalat	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	-
Iogurte Activia	Danone	<i>B. animalis</i> DN-173 010	Regular o funcionamento do intestino
Suplemento alimentar Biotura	Chr. Hansen	<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	Manter a flora intestinal em equilíbrio
Suspensão oral Leiba	União Química-Farmacêutica Nacional	<i>L. acidophilus</i>	Normalizar o equilíbrio da microbiota intestinal
Suspensão oral Biovicerin	Geyer	<i>Bacillus cereus</i>	Coadjuvante no tratamento da diarreia
Comprimidos Floratil	Merck	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Agente antidiarréico profilático e restaurador da flora intestinal fisiológica

FONTE: OLIVEIRA *et al.*, 2002, com inclusões do autor.

Pesquisas têm mostrado que a viabilidade celular dos probióticos nos produtos lácteos cai muito com o tempo de estocagem. A proteção destes probióticos usando a

técnicas de microencapsulamento melhora sua viabilidade tanto nos produtos quanto no trato intestinal. O microencapsulamento também protege as células durante processos de liofilização e congelamento e aumenta sua estabilidade durante a estocagem (KRASAEKOOPT *et al.* 2003).

2.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O interesse em desenvolver alimentos funcionais cresce a cada dia em função do potencial do mercado de alimentos e bebidas que podem melhorar a saúde e o bem estar dos consumidores (HILLIAM, 2000). Os alimentos funcionais melhoram a saúde humana e ajudam a prevenir doenças, além de fornecer uma nutrição básica (BERNER e O'DONNELL, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002; STANTON *et al.*, 2005). O termo “alimento funcional” é definido como um alimento modificado ou um ingrediente alimentar que fornece um benefício à saúde, além de satisfazer os requerimentos tradicionais de nutrição (SANDERS, 1998).

No Japão, a definição legal de alimento funcional foi estipulada em 1991, quando foi criada uma legislação específica, caracterizada pela sigla FOSHU – *Foods for Specified Health Use*, ou “alimentos para uso específico da saúde” (SANDERS, 1998). Em países como Estados Unidos e Canadá, o padrão para alimentos funcionais não é regulamentado, mas é permitido. Em outros, como Suécia e Holanda, são permitidos algumas atribuições quando aprovadas por um grupo de especialistas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

No Brasil, alegação de propriedade funcional é “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 2007). A legislação sobre alimentos funcionais é recente e regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA). A Resolução número 18, de 30 de abril de 1999 aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas na rotulagem de alimentos. E a Resolução número 19, de 30 de

abril de 1999 regulamenta os procedimentos para o registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b; OLIVEIRA *et al.*, 2002)

A primeira geração de alimentos funcionais envolvia a suplementação dos alimentos com constituintes como cálcio ou vitaminas, por seus reconhecidos atributos à saúde (ZIEMER e GIBSON, 1998). Produtos lácteos fermentados podem ser incluídos na categoria de alimentos funcionais devido ao seu elevado conteúdo de cálcio, que pode reduzir a osteoporose, hipertensão e câncer de cólon, e outros componentes benéficos à saúde. A funcionalidade de alimentos lácteos também pode ser atribuída a componentes como antioxidantes e microrganismos probióticos. Alimentos lácteos probióticos contendo bactérias benéficas à saúde são um importante segmento do mercado de alimentos funcionais (BATISH e GROVER, 2004). O conceito de alimentos funcionais tem seguido em direção aos aditivos alimentares que podem exercer um efeito positivo na composição da microbiota intestinal. As pesquisas têm se concentrado muito no estudo dos probióticos, porém, o interesse mais recente é em relação aos prebióticos (ZIEMER e GIBSON, 1998).

2.5.1 Prebióticos

Prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou de um número limitado de bactérias do cólon. Esta definição é muito parecida com a definição de fibra alimentar, com exceção de sua seletividade para certas espécies bacterianas (GIBSON e ROBERFROID, 1995; SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001). Ingredientes alimentares classificados como prebióticos devem apresentar três características importantes:

- 1) o substrato não deve ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado;
- 2) deve ser seletivo para as bactérias benéficas do cólon, estimulando o crescimento/metabolismo destes organismos;

3) devem alterar a microbiota para uma composição saudável através da indução benéfica de efeitos luminal/sistêmico no hospedeiro (GIBSON e FULLER, 2000).

Alguns peptídeos, proteínas e lipídeos contêm características prebióticas, mas os carboidratos é que têm recebido maior atenção de pesquisadores, principalmente os oligossacarídeos (tabela 5), que são fonte de carbono fermentescível para bactérias benéficas do cólon (ZIEMER e GIBSON, 1998; CRITTENDEN, 1999).

TABELA 5 – PRINCIPAIS OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZADOS COMO PREBIÓTICOS

Substâncias Prebióticas
Fruto-oligossacarídeos
Inulina
Galacto-oligossacarídeos
Lactulose
Lactosacarose
Isomalto-oligossacarídeos
Oligossacarídeos de soja (rafinose e estaquiose)
Xilo-oligossacarídeos
Gentio-oligossacarídeos

FONTE: RASTALL e MAITIN, 2002

A inulina e a oligofrutose são carboidratos armazenados em plantas e presentes em alimentos como alho, banana, cereais, cebola e em grande quantidade na raiz da chicória. A oligofrutose é um componente natural da inulina (DE BONDT, 2003).

Os prebióticos podem apresentar diferenças em suas características fermentativas. Estudos com alguns prebióticos revelaram que xilo-oligossacarídeos e lactulose produziram maior aumento no número de bifidobactérias, que fruto-oligossacarídeos propiciaram o desenvolvimento de lactobacilos e, ainda, que a mistura deles pode aumentar sua funcionalidade (RYCROFT *et al.*, 2001). Outros estudos mostraram que a inulina conduz a elevadas contagens de bifidobactérias e lactobacilos, porém, inferiores às contagens quando se utilizou oligossacarídeos de soja, isomalto-oligossacarídeos ou lactulose. O maior aumento na quantidade de

bifidobactérias foi determinado com xilo-oligossacarídeos e lactulose, enquanto o maior aumento no número de lactobacilos foi verificado com fruto-oligossacarídeos (RASTALL e MAITIN, 2002).

2.5.2 Simbióticos

O desenvolvimento de simbióticos é uma área muito promissora e de enorme interesse no campo dos alimentos funcionais diferenciados (RASTALL e MAITIN, 2002). Simbióticos são definidos como misturas de probióticos e prebióticos que beneficiam o hospedeiro por aumentar a sobrevivência e a implantação de suplementos microbianos selecionados. Devido aos benefícios nutricionais associados com a microbiota dominante, os alimentos são as principais matrizes para probióticos, prebióticos e simbióticos (GIBSON e ROBERFROID, 1995; ZIEMER e GIBSON, 1998).

Como a palavra “simbiótico” insinua sinergismo, este termo deveria ser reservado para produtos nos quais os componentes prebióticos favorecem seletivamente o probiótico presente. Entretanto, pode-se argüir que sinergismo é alcançado *in vivo*, por um lado pela ingestão de lactobacilos e por outro pelo estímulo do crescimento de bifidobactérias nativas (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001).

Com base nos objetivos e na revisão de literatura da presente pesquisa, foi desenvolvido um processo biotecnológico para o desenvolvimento de uma bebida natural fermentada, à base de água de coco, com características probióticas. Tal bebida destina-se ao uso humano, especialmente a consumidores vegetarianos e que apresentem intolerância à lactose e/ou às proteínas do leite. A bebida de origem vegetal é uma nova alternativa para o consumo de probióticos, em substituição aos produtos lácteos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

3.1 ÁGUA DE COCO

A água de coco, utilizada como substrato neste trabalho, foi extraída de cocos verdes adquiridos no comércio local. Os frutos, provenientes do estado da Bahia, eram da variedade anão verde, com 6 a 8 meses de maturação. Os cocos foram lavados em água corrente e perfurados com furador manual. A água de cada 12 unidades do fruto foi retirada, homogeneizada e filtrada em papel de filtro para eliminar partículas em suspensão. Posteriormente foi distribuída em garrafas plásticas de capacidade 1 litro e congelada em freezer até o momento de sua utilização.

3.1.1 Caracterização Físico-Química da Água de Coco

A caracterização da água de coco utilizada no presente estudo foi realizada em amostras de três diferentes frutos. As análises foram feitas em triplicata determinando-se o valor médio das seguintes variáveis:

- a) glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado e as condições de operação estão descritas no item 3.4.4;
- b) açúcares redutores pelo método do DNS ou ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959), cuja absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC;
- c) açúcares totais por hidrólise ácida dos açúcares presentes na amostra (AOAC, 2000). Os açúcares redutores gerados foram dosados pelo método do DNS (MILLER, 1959), cuja absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC.
- d) sólidos solúveis totais (IAL, 2005), expresso em ° Brix a 20° C, medidos em refratômetro de bancada da marca Instrutherm, modelo RT-30ATC, com compensação automática de temperatura;

- e) proteínas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), cuja absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC;
- f) pH pelo método potenciométrico (AOAC, 2000), utilizando um potenciômetro digital da marca Hanna.

3.1.2 Análise Estatística

Os dados apresentados representam a média das triplicatas. A análise estatística foi realizada por “one-way ANOVA” seguida de pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

3.2 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas neste trabalho seis diferentes espécies do gênero *Lactobacillus* e uma espécie do gênero *Bifidobacterium* (tabela 6).

TABELA 6 – MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO E SUAS RESPECTIVAS PROCEDÊNCIAS

Microrganismo	Procedência
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	ATCC
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	ATCC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> H-19	DEBB
<i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B4496	NRRL
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> E-2	DEBB
<i>Lactobacillus</i> sp. B-7	DEBB
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BFL-9	Danisco Brasil S/A

NOTA: DEBB - Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, ATCC - American Type Culture Collection, NRRL - Agricultural Research Service Culture Collection

As cepas de *Lactobacillus* mantidas em nitrogênio líquido a - 196° C foram ativadas em caldo MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960) e incubadas a 37 °C por 24 horas. A cepa de *Bifidobacterium* que se apresentava liofilizada foi ativada em

caldo TPY (SCARDOVI, 1986) e incubada em condições anaeróbicas a 37 °C durante 24 horas.

3.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DA MICROBIOTA DO COCO VERDE

A água de coco, preparada conforme o item 3.1, foi incubada em aerobiose à temperatura de 37 °C durante um período de 48 horas. A água de coco fermentada foi semeada em placas de Petri contendo ágar MRS com 0,3% (v/v) de uma solução de azul de anilina a 4% (p/v). As cepas de bactérias lácticas têm a propriedade de assimilar o corante do meio, facilitando o reconhecimento das características morfológicas das colônias (GIRAUD, 1992).

As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 48 horas. Colônias azuis isoladas foram repicadas em caldo MRS estéril e incubadas a 37 °C por 24 horas para posterior estudo de suas características morfológicas, físico-químicas e de crescimento.

3.3.1 Manutenção das Cepas Isoladas

As cepas utilizadas com maior frequência foram repicadas e mantidas a 4 °C em tubos contendo ágar MRS. Para manutenção a longo prazo, as cepas foram cultivadas em caldo MRS a 37 °C por 24 horas, centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e a biomassa, adicionada de 10% de glicerol, foi transferida para microtubos estéreis e conservada em nitrogênio líquido à temperatura de – 196 °C (GHERNA, 1999).

3.4 SELEÇÃO DAS CEPAS

A seleção das cepas isoladas foi realizada com base nas características morfológicas microscópicas, na coloração de Gram, na atividade de catalase, na produção de CO₂ a partir da glicose, no perfil de produção de ácidos orgânicos e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e na viabilidade das cepas a

sucessivas repicagens. As cepas que se mantiveram viáveis foram testadas quanto a sua capacidade de inibir microrganismos patogênicos.

3.4.1 Coloração de Gram e Características Microscópicas

As bactérias lácticas de interesse isoladas neste estudo devem ser Gram positivas, e se apresentar na forma de cocos, coco-bacilos ou bacilos (SCHLEIFER e LUDWIG, 1995).

3.4.2 Prova da Catalase

A atividade da catalase é uma característica importante em determinados grupos de bactérias. Este teste é utilizado para comprovar a presença ou não da enzima em culturas de microrganismos. Embora em raros casos possam apresentar “pseudo-catalase”, normalmente as bactérias lácticas são desprovidas da enzima, ou seja, são catalase-negativas (SCHLEIFER e LUDWIG, 1995).

Em uma lâmina de microscopia, gotas de solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (3% m/v) são adicionadas sobre algumas gotas do cultivo do microrganismo a ser testado. A liberação de bolhas de oxigênio indica a presença da enzima e um resultado positivo para o teste (PANCHENIAK, 2005).

3.4.3 Produção de Gás a Partir de Glicose

Para verificar a produção de gás a partir de glicose, as cepas foram cultivadas em tubos com caldo MRS (20g/L de glicose) adicionados de tubos de Durham invertidos para coletar o gás produzido durante o processo fermentativo. O caldo inoculado foi incubado a 37 °C por 48 horas. Após este período, a produção ou não de gás foi determinada visualmente (PANCHENIAK, 2005).

3.4.4 Quantificação de Açúcares e Ácidos Orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os ácidos orgânicos e os açúcares foram identificados e quantificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu modelo LC-10 AD, em coluna AMINEX HPX-87H da BIO-RAD. As condições de operação estão especificadas na tabela 7.

TABELA 7 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

Condições de Operação	
Fase móvel	H ₂ SO ₄ 5 mM
Temperatura do forno	60 °C
Vazão da fase móvel	0,6 mL/min
Pressão da bomba	50-54 kgf/cm ²
Volume injetado	50 µL
Volume analisado	20 µL

As amostras a serem analisadas foram centrifugadas a 4500 rpm por 15 minutos, diluídas com água ultra pura e filtradas em membrana de éster de celulose de 0,22 µm de poro.

TABELAS 8 – CONSTITUINTES E RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO DO PADRÃO UTILIZADO NAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Componente	Tempo de retenção (min)
Ácido cítrico	7,8
Glicose	8,8
Frutose	9,5
Ácido láctico	12,5
Ácido acético	14,6
Ácido propiônico	17,1
Etanol	21,2

Utilizou-se como padrão soluções de concentração 1 e 2 g/L dos constituintes apresentados na tabela 8, que mostra também os tempos de retenção de cada componente.

3.4.5 Atividade Inibitória Frente a Microrganismos Patogênicos

As cepas utilizadas no teste de atividade antimicrobiana foram cultivadas em caldo MRS por 48 horas e foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi dividido em duas porções. Uma, denominada tal qual (TQ), foi esterilizada em membrana de éster de celulose de 0,22 µm de poro e recolhida em microtubo estéril. A outra porção, denominada neutralizada (N), foi ajustada a pH 6,0 com NaOH 1N e posteriormente filtrada em membrana de éster de celulose de 0,22 µm e também recolhida em microtubo estéril.

A atividade inibitória frente a microrganismos patogênicos foi determinada inicialmente em microtubos de 1,5 mL, por densidade óptica a 660 nm (DO_{660}), em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. Os sobrenadantes foram adicionados em igual volume de caldo Mueller-Hinton (MH) e inoculados com 2% (v/v) dos microrganismos patogênicos previamente reativados em caldo MH e incubados a 37 °C “overnight”. Foi utilizado como controle (C+) o caldo MH com igual volume de caldo MRS adicionados de 2% da cultura do microrganismo patogênico. Os testes foram realizados em triplicata à temperatura de 37 °C.

Posteriormente, o teste de inibição de microrganismos patogênicos foi realizado em microplacas de ELISA e a leitura foi realizada em 630 nm utilizando o leitor de microplacas para teste de ELISA da marca BioTek modelo Power Wave XS e o programa KC Junior. Os sobrenadantes foram adicionados em igual volume de caldo Mueller-Hinton (MH) e inoculados com 10% (v/v) dos microrganismos patogênicos previamente reativados em caldo MH, incubados a 37 °C “overnight” e diluídos 1:10 com água destilada estéril. Foi utilizado como branco o caldo MH em igual volume de caldo MRS e como controle (C+) caldo MH em igual volume de caldo MRS adicionado de 10% das culturas dos microrganismos patogênicos. Os testes foram

realizados em triplicata, a temperatura de 37 °C. Na tabela 9 são descritos os microrganismos patogênicos utilizados neste teste.

Nos cálculos de porcentagem de inibição foi utilizada a equação 1:

$$I(\%) = \left(\frac{\text{Inc. DO controle} - \text{Inc. DO amostra}}{\text{Inc. DO controle}} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde: $I(\%)$ = porcentagem de inibição da amostra em relação ao controle;

Inc. DO controle = incremento da densidade óptica do controle;

Inc. DO amostra = incremento da densidade óptica da amostra.

TABELA 9 – CEPAS REFERÊNCIA UTILIZADAS NOS TESTES DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Microrganismos Patogênicos
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 10708
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
NOTA: ATCC - American Type Culture Collection

3.5 ESTUDO DO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS CEPAS ESCOLHIDAS PARA PRODUÇÃO DA BEBIDA

Na caracterização das cepas utilizadas na produção da bebida fermentada à base de água de coco foram realizados testes de crescimento e tolerância em diferentes níveis de pH, crescimento e tolerância a substâncias inibitórias como sais biliares e NaCl e crescimento em extremos de temperatura. Foram realizadas também provas bioquímicas de fermentação de diferentes fontes de carbono, detecção de isômeros de ácido láctico e resistência das cepas selecionadas frente a diferentes antibióticos.

3.5.1 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Níveis de pH

O crescimento das cepas escolhidas em baixos níveis de pH (2,0; 2,5 e 3,0) foi determinado por densidade óptica a 660 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC e comparado ao crescimento em pH 7,0. Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC (*Reinforced Clostridial*) para *Bifidobacterium* com pH ajustado para 2,0; 2,5; 3,0 e 7,0 foi inoculado com 3% (v/v) das culturas previamente reativadas. As leituras foram realizadas nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas (CONWAY *et al.*, 1987; PRASAD *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2006). O mesmo teste foi realizado posteriormente para o *Bifidobacterium* utilizando caldo RC com pH ajustado para 3,5; 4,0; 4,5 e 7,0.

A sobrevivência das cepas em diferentes níveis de pH foi determinada pela viabilidade celular nos tempos 0, 3 e 6 horas. Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC para *Bifidobacterium* com pH ajustado para 2,0; 2,5; 3,0 e 7,0 foram inoculados com 10% (v/v) das culturas previamente reativadas. A contagem das células viáveis foi determinada pelo método de “drop plate” (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982) em ágar MRS para os *Lactobacillus* e RCA (*Reinforced Clostridial Agar*) em anaerobiose para *Bifidobacterium*.

3.5.2 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de Bile

O crescimento das cepas em diferentes concentrações de sais biliares foi determinado por densidade óptica a 660 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC para *Bifidobacterium* com concentrações de bile bovina de 0%; 0,3%; 0,6% e 1,0% foi inoculado com 3% (v/v) das culturas previamente reativadas. As leituras foram realizadas em 0, 4, 8 e 24 horas (KLAENHAMMER e KLEEMAN, 1981; GILLILAND e WALKER, 1990; CHOU e WEIMER, 1999; PRASAD *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2006).

A sobrevivência das cepas em diferentes concentrações de sais biliares foi determinada pela viabilidade celular nos tempos 0, 3 e 6 horas. Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC para *Bifidobacterium* com 0%; 0,3%; 0,6% e 1,0% de bile foram inoculados com 10% (v/v) das culturas previamente reativadas. A contagem das células viáveis foi determinada pelo método de “drop plate” (HOBEN e

SOMASEGARAN, 1982) em ágar MRS para os *Lactobacillus* e RCA em anaerobiose para *Bifidobacterium*.

3.5.3 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de NaCl

O crescimento das cepas em diferentes concentrações de NaCl foi determinado por densidade óptica a 660 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC para *Bifidobacterium* com concentrações de 0%, 3%, 6% e 10% de NaCl foram inoculados com 3% (v/v) das culturas previamente reativadas. As leituras foram realizadas em 0, 4, 8 e 24 horas (CONWAY *et al.*, 1987; PANCHENIAK e SOCCOL, 2005).

A sobrevivência das cepas em diferentes concentrações de NaCl foi determinada pela viabilidade celular nos tempos 0, 3 e 6 horas. Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC para *Bifidobacterium* com 0%, 3%, 6% e 10% de NaCl foram inoculados com 10% (v/v) das culturas previamente reativadas. A contagem das células viáveis foi determinada pelo método de “drop plate” (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982) em ágar MRS para os *Lactobacillus* e RCA em anaerobiose para *Bifidobacterium*.

3.5.4 Crescimento das Cepas em Extremos de Temperatura

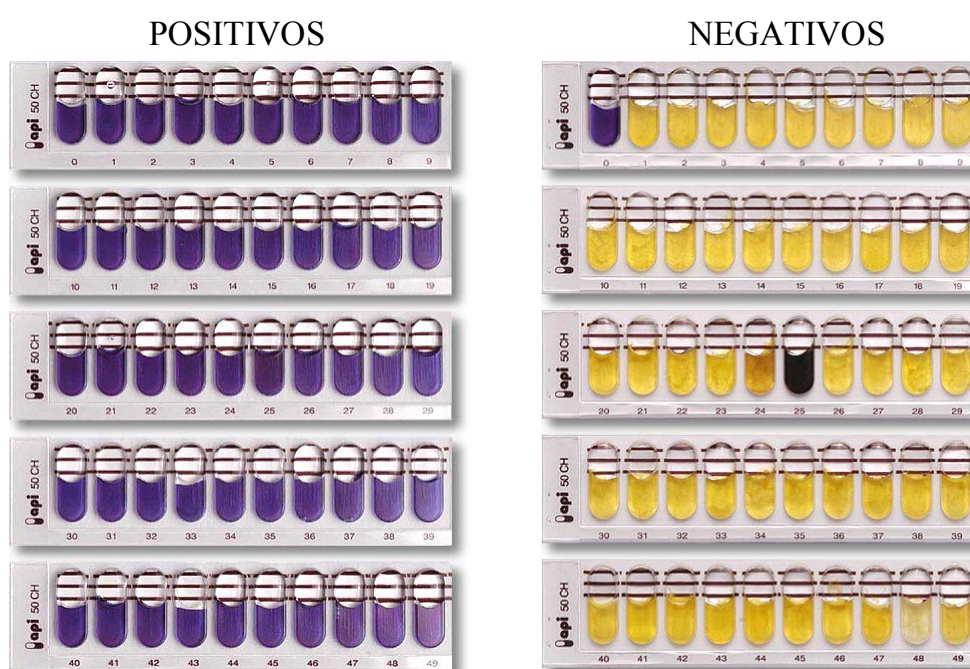
Caldo MRS para *Lactobacillus* ou RC para *Bifidobacterium* foi inoculado com 3% (v/v) das culturas previamente reativadas. O crescimento das cepas em temperaturas de 15 e 45 °C foi determinado pelo método de “drop plate” (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982) em ágar MRS para *Lactobacillus* e RCA em anaerobiose para *Bifidobacterium* nos tempos 0 e 24 horas. Um controle foi realizado em temperatura de 37 °C.

3.5.5 Identificação Bioquímica das Culturas

A identificação bioquímica das cepas de *Lactobacillus* escolhidas foi realizada por fermentação de 49 diferentes açúcares e um controle, usando a galeria API 50 CH

(BioMérieux, França) para fermentação bioquímica de bactérias lácticas. O microrganismo a ser estudado é cultivado em superfície no ágar MRS por 48 horas. Colônias isoladas são suspensas no meio API 50 CHL (BioMérieux, França) que contém púrpura de bromocresol. O meio inoculado é distribuído nos 50 microtubos da galeria, os quais são cobertos com vaselina líquida. A produção de ácidos orgânicos durante a incubação permite a mudança do indicador de pH para amarelo, com exceção do controle que permanece azul e da esculina (microtubo número 25) cuja coloração muda para preto, tal como na figura 11. Os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da cepa estudada, facilitando sua tipagem. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas de incubação a 37 °C. Os resultados foram interpretados usando o programa estatístico API 50CHL v 5.1 (BIOMERIEUX, 2007), que permite determinar o gênero e a espécie do microrganismo analisado.

FIGURA 11 – RESULTADOS DOS TESTES PARA AS GALERIAS API 50 CH



FONTE: BIOMERIEUX, 2007.

3.5.6 Identificação Molecular das Culturas

A identificação molecular das cepas escolhidas foi realizada no Laboratório de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

Foi utilizada a técnica de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). O DNA das amostras a serem identificadas e das cepas referência foi extraído pelo método CTAB-Fenol Clorofórmio (DOYLE e DOYLE, 1987; CULLINGS, 1992). A concentração do DNA foi quantificada a 260 nm em espectrofotômetro JenWay da marca Genova. Uma quantidade de 20 ng de DNA foi utilizada em volume reacional de 30 µL com tampão 1X, 1,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50 pmol de *primer* e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 10.

O DNA foi amplificado em termociclador da marca BioRad. Para os *primers* M13 e M14, os ciclos de amplificação foram de 94 °C por 5 min, 45 vezes de 94 °C por 1 min, 45 °C por 20 s, 72 °C por 2 min e finalmente 72 °C por 5 min. No caso do *primer* COC, o ciclo de amplificação foi de 94 °C por 5 min, 45 vezes de 94 °C por 1 min, 29 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, seguidos de 72 °C por 5 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,6% e visualizado em luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

TABELA 10 – *PRIMERS* UTILIZADOS NOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS

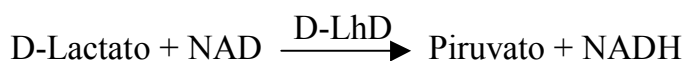
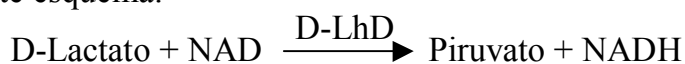
<i>Primer</i>	Seqüência	Referência
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	STENDID <i>et al.</i> , 1994
M14	5'-GAGGGTGGGGCCGTT-3'	ZAPPAROLI <i>et al.</i> , 2000
COC	5'-AGCAGCGTGG-3'	COCCONCELLI <i>et al.</i> , 1995

Para determinar a distância genética entre as cepas foi empregado o coeficiente de Jaccard, utilizando 1 para presença e 0 para ausência de bandas nos dados de RAPD. Com os dados obtidos pelos géis, foi realizada análise de agrupamento (módulo SAHN do NTSYS), utilizando o método da média das

distâncias genéticas (UPGMA – *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means*) e construção de dendrograma com o auxílio do programa NTSYSpc versão 2.1 (ROHLF, 2000).

3.5.7 Detecção de Isômeros de Ácido Láctico

Utilizou-se neste teste um “kit” enzimático para quantificação de D- e L-ácido láctico (Biosentec, França). A dosagem enzimática foi realizada em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC a 340 nm. Foram utilizadas as enzimas L-Lactato Desidrogenase (L-LdH), D-Lactato Desidrogenase (D-LdH) e Glutamato-Piruvato-Transaminase (GPT). O princípio do método está baseado em reações de óxi-redução enzimáticas. A enzima D-LdH oxida o D-Lactato em piruvato e simultaneamente reduz o NAD a NADH; a enzima L-LdH oxida o L-lactato em piruvato e reduz o NAD a NADH; e a enzima GPT oxida o piruvato a L-alanina e reduz o L-Glutamato a 2-oxoglutarato, conforme o seguinte esquema:



Os reagentes utilizados no teste e respectivas quantidades são apresentados no quadro 2, e foram adicionados na ordem em que aparecem. Os cálculos para determinação das quantidades de D-ácido láctico foram realizados utilizando as equações (2), (3) e (4) e para L-ácido láctico, as equações (5), (6) e (7):

$$\Delta\text{DO}_{\text{D-lac}} = [\text{DO2} - \text{DO1}]_{\text{amostra}} - [\text{DO2} - \text{DO1}]_{\text{branco}} \quad (2)$$

$$\text{C}_{\text{D-lac}} = [(\text{V} \times \text{PM}) / (\epsilon \times \text{D} \times \text{v} \times 1000)] \times \Delta\text{DO}_{\text{D-lac}} \quad (3)$$

$$\text{C}_{\text{D-lac}} = 0,3203 \times \Delta\text{DO}_{\text{D-lac}} \quad (4)$$

$$\Delta\text{DO}_{\text{L-lac}} = [\text{DO3} - \text{DO2}]_{\text{amostra}} - [\text{DO3} - \text{DO2}]_{\text{branco}} \quad (5)$$

$$\text{C}_{\text{L-lac}} = [(\text{V} \times \text{PM}) / (\epsilon \times \text{D} \times \text{v} \times 1000)] \times \Delta\text{DO}_{\text{L-lac}} \quad (6)$$

$$\text{C}_{\text{L-lac}} = 0,3232 \times \Delta\text{DO}_{\text{L-lac}} \quad (7)$$

onde C_{D-lac} = concentração de D-ácido láctico (g/L)

C_{L-lac} = concentração de L-ácido láctico (g/L)

V = volume total (2,24 mL para D-ácido láctico e 2,26 mL para L-ácido láctico)

v = volume da amostra (0,1 mL)

PM = peso molecular do ácido láctico (90,1 g/mol)

D = trajetória óptica (1 cm)

ε = coeficiente de extinção do NADH (6,3 L x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

QUADRO 2 – REAGENTES UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS D- E L-ÁCIDO LÁCTICO

Reagente	Constituinte	Branco	Amostra
R1	Ácido L-Glutâmico em tampão pH10	1 mL	1 mL
R2	NAD	0,2 mL	0,2 mL
R3	GPT	0,02 mL	0,02 mL
–	Água	1 mL	0,9 mL
–	Amostra	0	0,1 mL
	Agitar e ler a absorbância imediatamente →	DO1	DO1
R4	D-LdH	0,02 mL	0,02 mL
	Agitar e ler a absorbância após 45 min →	DO2	DO2
R5	L-LdH	0,02 mL	0,02 mL
	Agitar e ler a absorbância após 45 min →	DO3	DO3

FONTE: BIOSENTEC, 2007.

3.5.8 Resistência das Bactérias Frente a Diferentes Antibióticos

Nos testes de resistência das bactérias a diferentes antimicrobianos, foram utilizados discos com os antibióticos relacionados na tabela 11, com suas respectivas concentrações.

Aliquotas de 100 µL das culturas foram semeadas por espalhamento com alça de Drigalski em placas de Petri contendo ágar MRS para *Lactobacillus* ou RCA para *Bifidobacterium*. Em seguida, os discos de antibióticos de 6 mm de diâmetro foram depositados sobre o meio de cultivo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Utilizou-se anaerobiose para o *Bifidobacterium*. Foram então medidos os halos

de inibição formados ao redor de cada disco. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados representam a média dos valores obtidos, em milímetros.

TABELA 11 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS TESTES DE RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS

Antibiótico	Concentração (µg)
Amoxicilina	10
Cefalexina	30
Cloranfenicol	30
Eritromicina	15
Gentamicina	120
Lincomicina	02
Penicilina G	10

3.6 PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO

3.6.1 Inóculos

Os inóculos das cepas de *Lactobacillus* foram preparados em caldo MRS ou em caldo RC esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Após inoculação com 3% (v/v) da cultura, o caldo foi incubado a 37 °C durante 24 horas. O inóculo da cepa de *Bifidobacterium* foi preparado em caldo RC esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. Após inoculação com 3% (v/v) da cultura, o caldo foi incubado a 37 °C durante 24 horas em condições anaeróbicas.

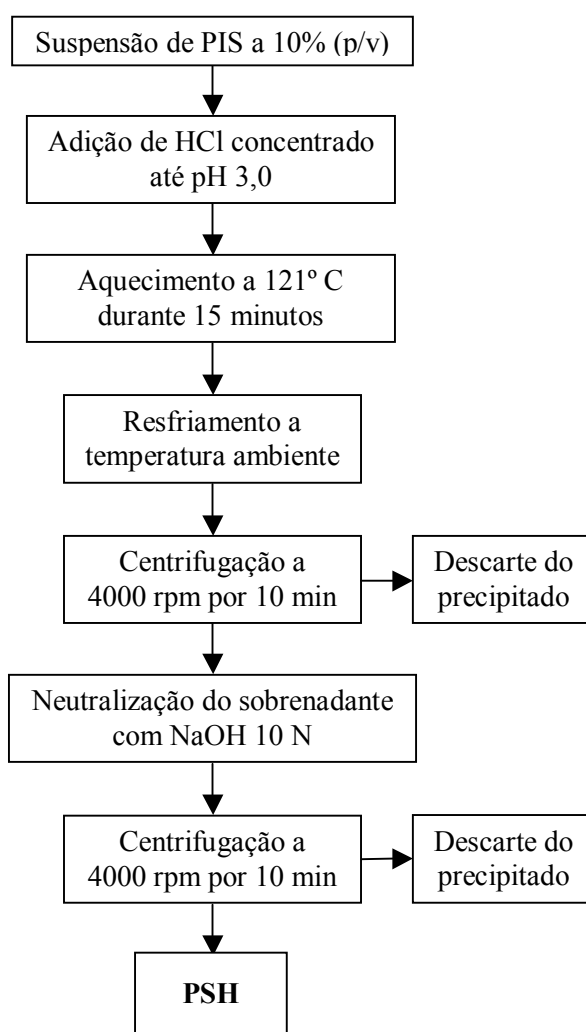
3.6.2 Testes com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio

Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram adicionadas à água de coco. Após ajuste de pH em 5,5, o meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. O meio à base de água de coco foi resfriado e inoculado. Acompanhou-se o incremento de densidade óptica a 660 nm (IDO₆₆₀) com o tempo de incubação a 37 °C. As fontes de carbono testadas foram mel, açúcar mascavo, melaço de cana-de-açúcar e sacarose. Entre as fontes de nitrogênio foram testadas extrato de levedura, proteína de soja

hidrolisada e leite de soja em pó. Foi testado também o IDO₆₆₀ com adição de leite de coco.

A proteína de soja hidrolisada (PSH), utilizada como fonte de nitrogênio na produção da bebida fermentada, foi obtida através de hidrólise ácida de proteína isolada de soja (PIS), conforme fluxograma apresentado na figura 12. A quantidade de proteína no hidrolisado foi dosada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) em comprimento de onda de 540 nm.

FIGURA 12 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA



3.6.3 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Pura

Com o objetivo de otimizar as quantidades dos melhores suplementos e estudar seus efeitos no processo fermentativo de produção da bebida à base de água de coco, foi realizado um primeiro planejamento experimental 3^{3-1} com 3 fatores em 3 níveis, realizado em duplicata, totalizando 18 ensaios. A tabela 12 mostra os níveis codificados utilizados para cada fator testado. Os resultados obtidos foram analisados usando o software Statistica v 5.1 (STATSOFT, 1998).

TABELA 12 – NÍVEIS CODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3^{3-1} PARA CULTURA PURA

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	0	+1
3	-1	+1	0
4	0	-1	+1
5	0	0	0
6	0	+1	-1
7	+1	-1	0
8	+1	0	-1
9	+1	+1	+1

A resposta do experimento foi o incremento de densidade óptica a 660 nm após 8 horas de incubação do meio à base de água de coco a 37 °C. A água de coco suplementada com extrato de levedura (EL), proteína de soja hidrolisada (PSH) e sacarose foi esterilizada a 121 °C durante 15 minutos. Utilizou-se uma taxa de inóculo de 3% (v/v) de AC-1 e pH inicial de 4,5. Na tabela 13 estão os níveis decodificados das variáveis estudadas.

TABELA 13 – NÍVEIS DECODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3^{3-1} PARA CULTURA PURA

Fator	Nível		
	-1	0	+1
EL (%)	0,02	0,05	0,08
PSH (mL %)	5	12,5	20
SACAROSE (%)	0,5	1,5	2,5

3.6.4 Estudo Cinético com Cultura Pura

A água de coco foi suplementada com 1,4% de sacarose, 0,05% de extrato de levedura e 2 mL % de proteína de soja hidrolisada e seu pH foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 1N. O meio à base de água de coco (MAC) foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, inoculado com 3% (v/v) da cultura pura e incubado a 37 °C. Foram retiradas amostras nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas de fermentação para acompanhar a variação do pH, crescimento celular por DO₆₆₀ e por contagem de células viáveis.

As leituras de DO₆₆₀ foram realizadas em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. O número de células viáveis foi determinado pelo método de “drop plate” (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982) em ágar MRS.

3.6.5 Estabilidade Físico-Química e Microbiológica da Bebida Fermentada com Cultura Pura

Para o acompanhamento da estabilidade físico-química e microbiológica, foram preparados 200 mL da bebida fermentada à base de água de coco conforme o item 3.6.4. O meio à base de água de coco foi inoculado com 3% (v/v) da cultura pura e incubado a 37 °C durante 8 horas. A bebida foi distribuída em tubos de ensaio de 20 mL e armazenada sob refrigeração a 5 °C. Foi determinado o pH da bebida e a quantidade de células viáveis pelo método de “drop plate” (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982) em ágar MRS. As análises foram realizadas a partir do primeiro dia, em intervalos de 7 dias, até o 42º dia de estocagem.

3.6.6 Tratamento Térmico da Água de Coco

No tratamento térmico da água de coco foram realizados testes combinando diferentes tempos de exposição a diferentes temperaturas. Foram realizadas diluições sucessivas e as amostras foram semeadas em placas de Petri com Ágar para Métodos Padronizados utilizado para contagem de mesófilos em alimentos. As placas foram

incubadas durante 48 horas a 37 °C e os resultados foram expressos em UFC/mL. As contagens foram realizadas em duplicata.

3.6.7 Testes com Culturas Mistas

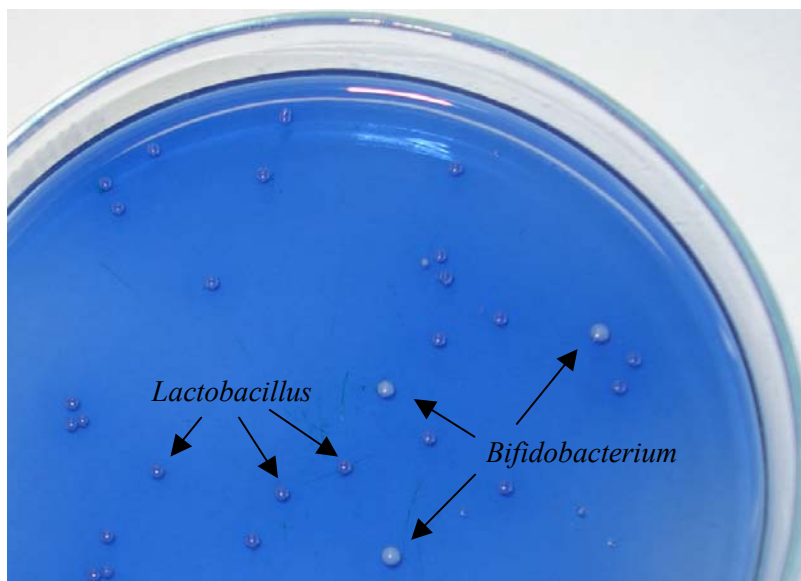
A água de coco foi suplementada com 1,4% de sacarose, 0,05% de extrato de levedura e 2 mL % de proteína de soja hidrolisada e seu pH foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 1N. O meio à base de água de coco (MAC) foi pasteurizado em vapor fluente durante 15 minutos e imediatamente resfriado em água corrente até temperatura ambiente (choque térmico). O MAC foi inoculado com 3% (v/v) de uma cultura pura (AC-1), ou de uma mistura 1:1 de AC-1 e BFL-9 ou ainda de uma mistura 1:1:1 de AC-1, B-7 e BFL-9, e foi incubado em condições anaeróbicas a 37 °C. Foram retiradas amostras nos tempos 0, 4, 8 e 10 horas de fermentação para acompanhar a variação do pH, crescimento celular por DO₆₆₀ e por contagem de células viáveis totais, consumo de glicose e de frutose e produção de ácido láctico por CLAE (item 3.4.4).

Amostras do produto fermentado durante 8 horas foram armazenadas a 5 °C durante 28 dias. Após esse período, foi determinado o pH, a contagem de células viáveis totais e as concentrações de glicose, frutose e ácido láctico por CLAE.

3.6.8 Contagem de Células Viáveis de Cultura Mista

O número de células viáveis totais das culturas mistas foi determinado por contagem padrão em placas. Após diluições sucessivas, as amostras foram semeadas em placas com RCA contendo azul de anilina e incubadas em anaerobiose a 37 °C durante 72 horas. Neste meio de cultivo diferencial, o *Bifidobacterium* cresce na forma de colônias de coloração clara, enquanto as colônias de *Lactobacillus* crescem em coloração azul (figura 13). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

FIGURA 13 – CRESCIMENTO DIFERENCIAL DE *Lactobacillus* E *Bifidobacterium* EM MEIO DE CULTIVO REINFORCED CLOSTRIDIAL ÁGAR COM AZUL DE ANILINA



3.6.9 Teste com Prebiótico e Cultura Mista

A água de coco foi suplementada com 0,05% de extrato de levedura e 2 mL % de proteína de soja hidrolisada. Uma parte foi utilizada como controle e nas outras duas foi adicionado 1,4% de sacarose ou 1,4% de inulina (Raftiline® ST Gel, Orafti). O pH dos meios foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 1N. Os meios à base de água de coco foram pasteurizados em vapor fluente durante 15 minutos e imediatamente resfriados em água corrente até temperatura ambiente (choque térmico). Os meios foram inoculados com 3% (v/v) da cultura mista de AC-1, B-7 e BFL-9 na proporção de 1:1:1 e foram incubados em condições anaeróbicas a 37 °C. Foram retiradas amostras nos tempos 0, 4 e 8 horas de fermentação para acompanhar o crescimento celular por DO₆₆₀.

3.6.10 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Mista

O segundo planejamento experimental foi composto central rotacional com 3 fatores. O delineamento incluiu 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 2 repetições do ponto central. A tabela 14 mostra os níveis codificados para cada um dos fatores testados.

TABELA 14 – NÍVEIS CODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 FATORES PARA CULTURA MISTA

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0

O teste foi realizado em triplicata, totalizando 48 ensaios. A resposta do experimento foi o incremento de densidade óptica a 660 nm após 8 horas de incubação do meio à base de água de coco a 37 °C. A água de coco suplementada com extrato de levedura (EL), proteína de soja hidrolisada (PSH) e sacarose foi pasteurizada em vapor fluente durante 15 minutos. Utilizou-se uma taxa de inóculo de 3% (v/v) da cultura mista de AC-1, B-7 e BFL-9 (1:1:1) e pH inicial de 6,0. Os resultados obtidos foram analisados usando o software Statistica v 5.1 (STATSOFT, 1998). A tabela 15 mostra os níveis decodificados das variáveis estudadas.

TABELA 15 – NÍVEIS DECODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 FATORES PARA CULTURA MISTA

Fator	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
EL (%)	0,00	0,04	0,10	0,16	0,20
PSH (mL %)	0,00	1,21	3,00	4,79	6,00
Sacarose (%)	0,00	0,81	2,00	3,19	4,00

3.6.11 Estudo Cinético com Cultura Mista

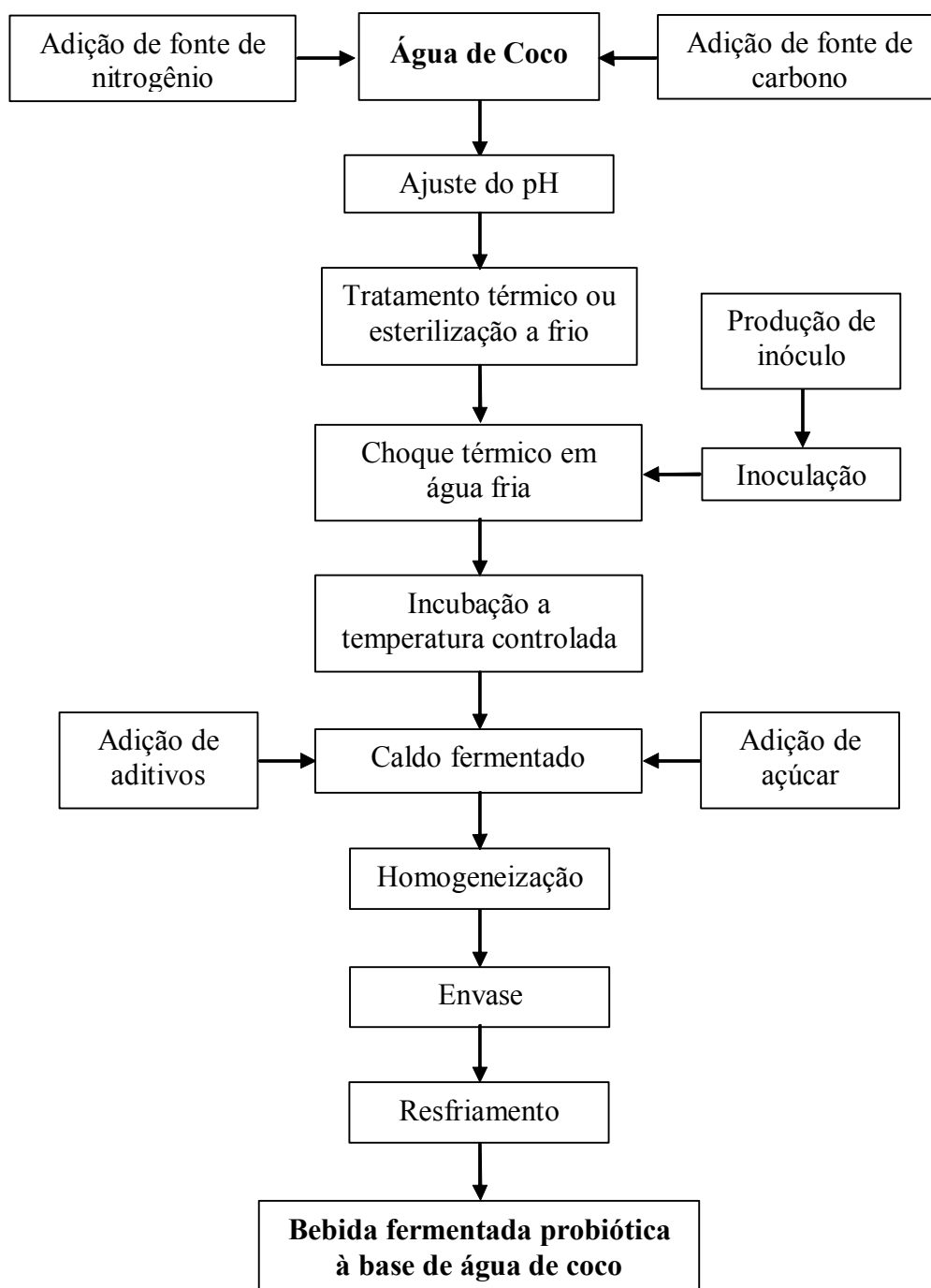
A água de coco foi suplementada com 0,05% de extrato de levedura, 2,3% de sacarose e 3,5 mL % de proteína de soja hidrolisada e seu pH foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 1N. O meio à base de água de coco (MAC) foi pasteurizado em vapor fluente durante 15 minutos, inoculado com 3% (v/v) da cultura mista de AC-1, B-7 e BFL-9 (1:1:1) e incubado a 37 °C em condições anaeróbicas. Foram retiradas amostras nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação para acompanhar a variação do pH, crescimento celular de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* contagem de células viáveis, consumo de glicose e frutose e produção de ácido láctico por CLAE (item 3.4.4).

3.6.12 Produção da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

O fluxograma apresentado na figura 14 mostra um esquema geral das etapas necessárias para produção da bebida fermentada à base de água de coco.

Para o acompanhamento da estabilidade físico-química e microbiológica, realização da avaliação sensorial e cálculo do valor calórico, foram preparados 2 L de meio à base de água de coco. Após adição de 0,05% de extrato de levedura, 3,5 mL % de proteína de soja hidrolisada e 2,3% de sacarose, o pH da água de coco foi ajustado para 6,0 com NaOH 1N. O caldo foi pasteurizado em vapor fluente durante 15 minutos e imediatamente resfriado em água corrente até temperatura ambiente. O meio à base de água de coco foi inoculado com 3% (v/v) de uma cultura mista de AC-1, B-7 e BFL-9 (1:1:1) e incubado em condições anaeróbicas a 37 °C durante 10 horas. A bebida foi distribuída em frascos Erlenmeyer de 125 mL para acompanhamento da estabilidade físico-química e microbiológica, em frascos Erlenmeyer de 500 mL para os teste de análise sensorial e em frascos de 500 mL para avaliação microbiológica no tempo zero e após 30 dias da data de fabricação. Todo o material foi mantido sob refrigeração a 5 °C até o momento de sua utilização.

FIGURA 14 – FLUXOGRAMA GERAL PARA PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO



3.6.13 Estabilidade Físico-Química e Microbiológica da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

A bebida fermentada à base de água de coco, preparada conforme o item 3.6.12, foi armazenada sob refrigeração a 5 °C para avaliação de sua estabilidade

físico-química e microbiológica. As contagens foram realizadas no primeiro e no 28º dia de estocagem. Foi determinado o pH da bebida e a quantidade de células viáveis de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* conforme o item 3.6.8.

3.6.14 Análise Sensorial da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

A bebida fermentada à base de água de coco, preparada de acordo com o item 3.6.12, foi dividida em duas porções; uma foi mantida tal qual e na outra foi adicionado 3% (p/v) de açúcar e 0,005% (v/v) de aroma artificial de coco da marca Nilú. Esta foi homogeneizada vigorosamente até dissolução completa do açúcar. As duas amostras da bebida foram comparadas a uma amostra padrão, a água de coco *in natura*.

As amostras foram apresentadas aos julgadores em copos transparentes de poliestireno (20 mL/copo) codificados aleatoriamente com três dígitos (ABNT 1994). Foi utilizada escala hedônica estruturada de 7 pontos em que as características avaliadas foram aspecto, aroma, sabor, cor e avaliação global. Os julgadores avaliaram ainda se as amostras eram melhores ou piores que o padrão em relação ao sabor utilizando uma escala hedônica estruturada de 5 pontos (anexo 2).

Participaram da avaliação sensorial estudantes e professores da Universidade Federal do Paraná, totalizando 20 provadores não treinados. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (MONTEIRO, 1984).

3.6.15 Avaliação Microbiológica da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

A avaliação microbiológica de *Salmonella* sp. e Coliformes a 35 e 45° C foi realizada no 6º e no 35º dias após a data de produção da bebida fermentada à base de água de coco. A metodologia utilizada nos testes estão descritas na Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003 (BRASIL, 2003).

3.6.16 Determinação do Valor Calórico da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

Foram determinadas as quantidades de proteínas e açúcares presentes na bebida fermentada à base de água de coco para realizar o cálculo do valor calórico da bebida, preparada conforme o item 3.6.12.

As análises realizadas foram:

- a) glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o equipamento e as condições de operação descritas no item 3.4.4;
- b) proteínas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), cuja absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO

As características físico-químicas da água de coco podem variar com a cultivar, com a idade de colheita ou mesmo com a época do ano. A determinação das quantidades médias de glicose, frutose, açúcares redutores, açúcares totais, proteínas, sólidos solúveis totais (SST) e pH foi realizada em triplicata na água de coco de três diferentes frutos. As médias constam na tabela 16.

TABELA 16 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE DIFERENTES AMOSTRAS DE ÁGUA DE COCO VERDE COM 6-8 MESES DE MATURAÇÃO

Variável	Frutos		
	A	B	C
pH	5,01 ^a	5,67 ^b	5,94 ^c
SST (° Brix a 20° C)	5,00 ^a	5,20 ^b	5,40 ^c
Proteínas (g/L)	0,23 ^a	0,23 ^a	0,29 ^b
Glicose (g/L)	21,59 ^a	18,86 ^b	19,52 ^b
Frutose (g/L)	23,79 ^a	18,47 ^b	18,89 ^b
Açúcares redutores (g/L)	44,77 ^a	38,22 ^b	36,73 ^b
Açúcares totais (g/L)	45,03 ^a	46,46 ^a	46,01 ^a

NOTA: letras diferentes na mesma linha significam diferença significativa com $p < 0,05$

O pH da água de coco aumenta com a idade de colheita do fruto (DA COSTA *et al.*, 2006). No ponto ótimo de colheita o pH pode variar de 4,0 a 5,7, podendo chegar até 6,7 no 9º mês de maturação (DE CARVALHO *et al.*, 2006). Os valores de pH das três mostras analisadas apresentaram diferença significativa entre si, embora todos tenham ficado dentro dos valores mencionados na literatura. Conforme a Instrução Normativa n. 39 de 28 de maio de 2002 que aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade da água de coco (BRASIL, 2002), o pH mínimo da água de coco deve ser de 4,3, porém, não há um limite máximo para esta variável.

Para sólidos solúveis totais (SST) a legislação refere-se à quantidade de, no máximo, 7° Brix, podendo inclusive ser corrigida com a adição de açúcares em quantidade não superior a 1 g/100 mL (BRASIL, 2002). Na literatura encontraram-se valores que variam de 5,2 até 8,2 °Brix para frutos com 7 meses de maturação (DE CARVALHO *et al.*, 2006). Apenas a amostra “A” ficou abaixo dos valores referenciados. MAGALHÃES *et al.* (2005) encontraram valores de 4,8 a 5,3 °Brix em frutos com aproximadamente 7 meses de maturação, indicando que este fruto foi colhido antes do 7° mês de maturação, o que não foi verificado com os frutos B e C. Entre os valores médios de SST apresentados na tabela 16, também houve diferença significativa.

As amostras A e B não apresentaram diferença significativa nas quantidades de proteínas, mas foram estatisticamente diferentes da amostra C. A maioria dos pesquisadores que realizaram a caracterização físico-química da água de coco não determinaram a quantidade de proteínas em sua composição. Entre os autores que o fizeram, a variação dos dados obtidos é grande. Nos estudos realizados por MAGALHÃES *et al.* (2005), são referenciados valores que variam de 1,01 a 1,27 g de proteínas por litro de água de coco; enquanto ARAGÃO (2000) cita o valor de 3,7 mg de proteínas por litro de água de coco. Assim, as quantidades de proteínas das amostras analisadas ficaram em conformidade com os valores encontrados na literatura.

Em frutos com 7 meses de maturação foram encontrados valores médios de 19,5 g de glicose e 20,0 g de frutose por litro de água de coco. Até o 7° mês de maturação, a quantidade de glicose geralmente é menor que de frutose. A partir daí, essa relação não segue essa ordem (ARAGÃO *et al.*, 2003). Os dados apresentados na tabela 16 ficaram muito próximos dos valores citados. Observou-se que a amostra A, cujo pH foi o menor entre as amostras estudadas, apresentou as maiores concentrações de glicose e frutose, e consequentemente a maior porcentagem de açúcares redutores. Somente nesta amostra a quantidade de frutose foi superior à quantidade de glicose. Nas demais amostras ocorreu o contrário. Não foi verificada diferença significativa nas quantidades médias de glicose e de frutose entre as amostras B e C; mas entre as

amostras A e B e entre A e C houve diferença significativa nas quantidades de glicose e frutose.

A mesma tendência observada em relação às quantidades de glicose e frutose foi verificada para açúcares redutores. Entre as amostras A e B e entre A e C houve diferença significativa, o que não ocorreu entre B e C. Na literatura foram encontrados valores que variam de 22 a 64 g/L de açúcares redutores (ARAGÃO, 2000; DE CARVALHO *et al.*, 2006). Com base nestes dados, a quantidade de açúcares redutores da água de coco dos três frutos estudados ficou dentro dos valores mencionados. Nota-se que as somas das quantidades de glicose e frutose ficaram muito próximas dos valores encontrados para açúcares redutores nas três amostras analisadas (tabela 16).

As quantidades de açúcares totais encontradas na água dos três frutos analisados não apresentaram diferença significativa entre si. A menor quantidade de açúcares não redutores, provavelmente de sacarose, foi encontrada na amostra A (0,26 g/L) confirmando a hipótese de que, entre os três frutos estudados, o fruto A foi colhido em um estágio de maturação inferior aos frutos B e C. Nestes, a quantidade de sacarose foi significativamente superior com valores de 8,24 e 9,28 g/L para os frutos B e C, respectivamente. Quantidades de sacarose variando de 0 a 59 g/L foram mencionadas na literatura em frutos com 7 meses de maturação (DE CARVALHO *et al.*, 2006).

A água de coco sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto. Além do grau de maturação, outros fatores como variedade, região e época do ano também têm influência sobre suas características físico-químicas (JAYALEKSHMY *et al.*, 1998).

4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

Diferentes colônias de bactérias que apresentaram coloração azul em ágar MRS contendo o corante azul de anilina, tal como na figura 15, foram repicadas em caldo MRS e cultivadas por 24 horas para estudo de suas características. Segundo TORO (2005), colônias de diferentes espécies de bactérias lácticas podem se

desenvolver de forma diferenciada quanto ao tamanho, bordas e elevação central da colônia.

FIGURA 15 – MEIO DE CULTIVO E COLÔNIAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM ÁGAR MRS COM AZUL DE ANILINA



4.2.1 Características Morfológicas, Atividade de Catalase e Produção de CO₂ pelas Cepas Isoladas da Microbiota do Coco Verde

As bactérias isoladas em caldo MRS foram inicialmente submetidas à coloração de Gram, prova da catalase e produção de CO₂ a partir da glicose. Os resultados são apresentados na tabela 17.

Todas as bactérias estudadas apresentaram reação negativa na prova da catalase e positivas na coloração de Gram. Segundo SCHLEIFER e LUDWIG (1995), todas as bactérias lácticas são Gram positivas e catalase negativas, embora algumas raras exceções apresentem pseudo-catalase.

TABELA 17 – COLORAÇÃO DE GRAM, PROVA DA CATALASE E PRODUÇÃO DE CO₂ PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DA MICROBIOTA DO COCO VERDE

Cepas	Características microscópicas	Catalase	CO ₂
AC-1	Bacilos Gram positivos de tamanho médio	-	-
AC-2	Coco-bacilos Gram positivos de tamanho pequeno	-	-
AC-3	Coco-bacilos Gram positivos de tamanho pequeno	-	-
AC-5	Coco-bacilos Gram positivos de tamanho médio	-	+
AC-6	Coco-bacilos Gram positivos de tamanho médio	-	+
AC-7	Coco-bacilos Gram positivos de tamanho pequeno	-	-
AC-8	Coco-bacilos Gram positivos de tamanho pequeno	-	-

Somente as cepas AC-5 e AC-6 produzem CO₂ a partir da glicose, o que as classifica com bactérias heterofermentativas, conforme HAMMES e VOGEL (1995). A produção de gás é uma característica bioquímica utilizada pela indústria de alimentos e como ferramenta bioquímica de identificação; já que nem todas as bactérias lácticas têm a propriedade de produção de gás a partir da glicose (TORO, 2005).

4.2.2 Perfil de Produção de Ácidos Orgânicos das Cepas Isoladas

Na sequência, foi realizado um estudo para avaliar o perfil da produção de etanol, de ácidos orgânicos como cítrico, láctico, acético e propiônico, e o consumo de glicose pelas diferentes cepas isoladas da água de coco fermentada. Os resultados são apresentados na tabela 18.

Observa-se que existe diferença em relação à produção de ácido láctico pelas bactérias estudadas. A cepa AC-1 produz em torno de 19 g/L de ácido láctico, a cepa AC-8 produz em torno de 17 g/L e as demais cepas produzem entre 13,8 e 15,1 g/L de ácido láctico. Todas as cepas produzem pequenas quantidades de ácido acético (0,8 a 3,3 g/L) e de ácido propiônico (2,2 a 3,6 g/L). Com exceção de AC-1, todas as cepas produzem etanol em quantidades que variam de 4,2 a 6,2 g/L e somente as cepas AC-2, AC-3, AC-5 e AC-7 produzem ácido cítrico em relação ao branco.

Com base no perfil apresentado na tabela 18 todas as cepas isoladas foram classificadas como heteroláticas obrigatórias. Apenas a cepa AC-1, que produziu quantidade negligenciável de etanol e não produziu CO₂, pode ser classificada como heterolática facultativa (HAMMES e VOGEL, 1995).

TABELA 18 – CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ETANOL PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DA MICROBIOTA DO COCO VERDE

Amostra	Componente (g/L)					
	Ácido cítrico	Glicose	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiônico	Etanol
Branco	2,96	24,75	0,89	3,71	1,73	0
AC-1	2,98	5,35	19,96	4,48	1,72	0,06
AC-2	3,45	5,02	15,40	5,51	2,22	5,43
AC-3	3,51	4,79	15,74	5,17	2,34	5,60
AC-5	3,44	4,42	15,87	5,44	2,22	5,44
AC-6	2,85	10,33	14,72	6,97	3,37	5,57
AC-7	8,98	7,73	15,98	6,28	3,14	6,22
AC-8	2,94	6,52	17,72	6,83	3,63	5,74

4.2.3 Viabilidade das Cepas Isoladas

No estudo de cepas isoladas, a manutenção da viabilidade celular é um aspecto de extrema importância. As culturas AC-2, AC-3, AC-7 e AC-8 perderam completamente sua viabilidade, mesmo quando mantidas em nitrogênio líquido. Entre as sete cepas isoladas, apenas as culturas AC-1, AC-5 e AC-6 se mantiveram viáveis a sucessivas repicagens. Portanto, os estudos seguintes foram realizados utilizando estas três cepas isoladas da água de coco.

4.2.4 Atividade Inibitória Frente a Microrganismos Patogênicos

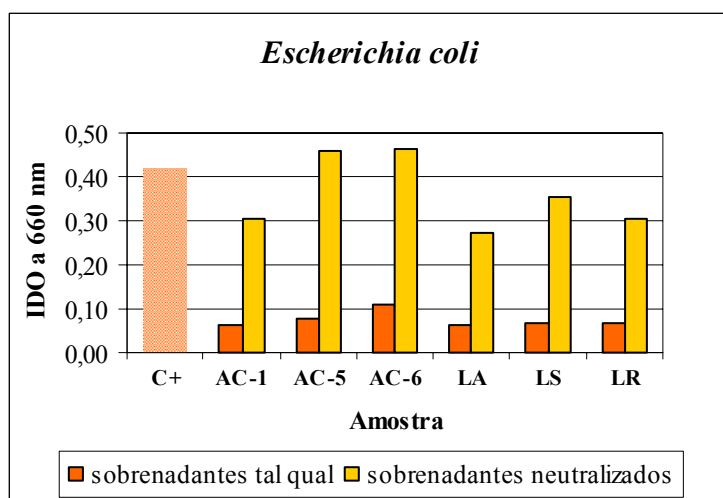
O poder inibitório das bactérias lácticas selecionadas foi testado inicialmente em microtubos frente a quatro potentes cepas de microrganismos patogênicos, muito

encontrados em alimentos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

As leituras de densidade óptica a 660 nm (DO₆₆₀) foram realizadas em 0 e 8 horas de incubação, com exceção da *L. monocytogenes*, cujo crescimento é mais lento e a DO₆₆₀ foi monitorada com 0 e 24 horas de incubação. A capacidade de inibição dos sobrenadantes das cepas isoladas foi comparada com a inibição causada por três cepas conhecidas: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (LA), *Lactobacillus rhamnosus* H-19 (LR) e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 (LS). As duas primeiras são de origem humana e a última isolada do “moto” – *starter* usado na produção do saquê.

Os gráficos de incremento da DO₆₆₀ em relação ao tempo zero são apresentados nas figuras 16 a 19.

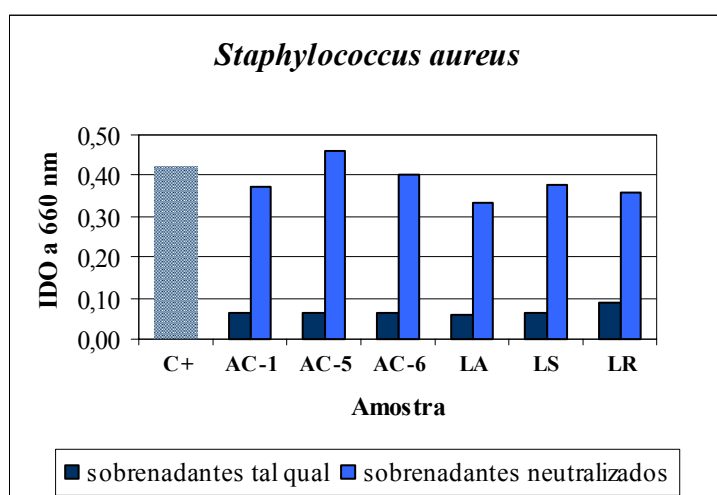
FIGURA 16 – INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Na figura 16 pode-se observar que os sobrenadantes tal qual (TQ) de todas as amostras inibiram fortemente o crescimento da *Escherichia coli* em 8 horas de incubação. A maior porcentagem de inibição em relação ao controle foi de 85% para AC-1, seguida pelas cepas de *Lactobacillus acidophilus* (LA) e *Lactobacillus rhamnosus* (LR), com 84% de inibição. No caso dos sobrenadantes neutralizados (N), a maior inibição foi causada pelo LA com 34 % em relação ao controle, seguida pelas amostras AC-1 e LR com 27% de inibição.

No caso do *Staphylococcus aureus* (figura 17), também houve forte inibição pelos sobrenadantes TQ de todas as amostras em 8 horas de incubação. A maior porcentagem de inibição em relação ao controle foi de 87% para LA. A menor porcentagem de inibição foi do LR com 80% e as demais amostras inibiram 85% o crescimento do patógeno em relação ao controle. Quanto aos sobrenadantes neutralizados (N), a maior inibição foi causada pelo LA com 21%, seguido pelo LR com 16% e pela amostra AC-1 com 12% de inibição.

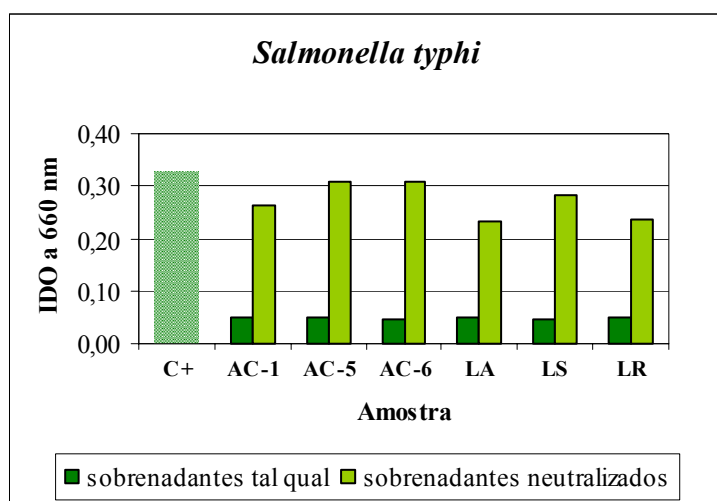
FIGURA 17 – INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



No gráfico da figura 18 se observa que os sobrenadantes tal qual (TQ) de todas as amostras também inibiram o crescimento da *Salmonella typhi* em 8 horas de incubação.

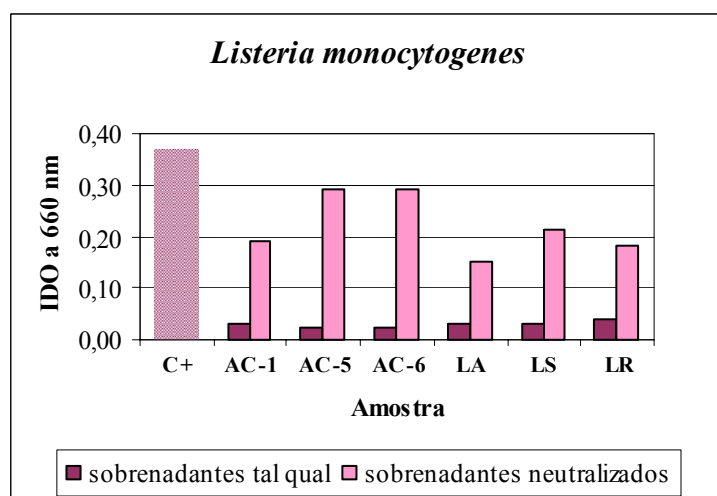
Não houve diferença significativa entre a porcentagem de inibição dos sobrenadantes TQ. A média de inibição ficou em torno de 85%. Entre os sobrenadantes N, a maior porcentagem ocorreu com a amostra de LA inibindo 29% o crescimento da *Salmonella*, seguido pelo LR e AC-1 com 28% e 20% de inibição, respectivamente (figura 18).

FIGURA 18 – INIBIÇÃO DE *Salmonella typhi* EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Todas as amostras TQ inibiram o crescimento da *Listeria monocytogenes* em 24 horas de incubação, como apresentado na figura 19. Também não houve diferença significativa entre a porcentagem de inibição da *Listeria* pelos sobrenadantes TQ, ficando uma média de 92% de inibição em relação ao controle. Entre as amostras neutralizadas, o LA apresentou a maior porcentagem de inibição com 59%. Em seguida veio LR com 51% e AC-1 com 49% de inibição do crescimento do patógeno.

FIGURA 19 – INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM MICROTUBOS PELOS SOBRENADANTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

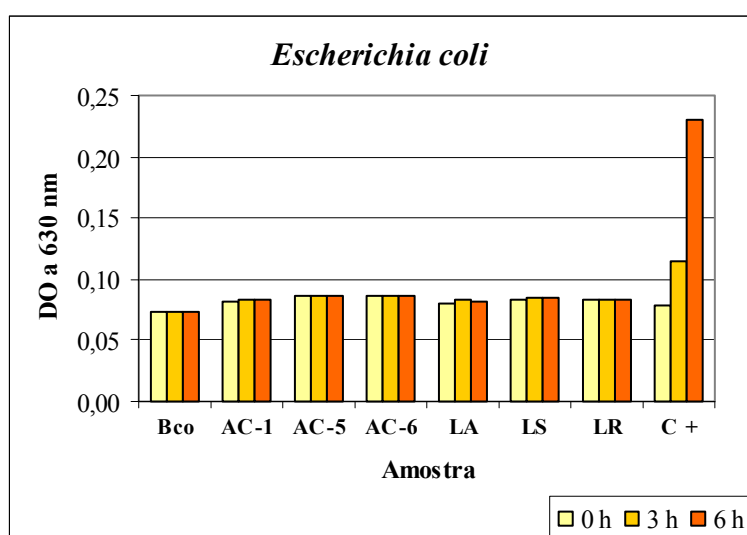


Dos quatro microrganismos patogênicos utilizados neste estudo, os sobrenadantes testados foram capazes de inibir em maior porcentagem a *Listeria monocytogenes*, tanto com as amostras tal qual como com as neutralizadas. Em todos os casos, as amostras tal qual apresentaram porcentagens de inibição superiores às amostras neutralizadas. Em geral, ácidos orgânicos têm uma forte atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas (MAKRAS E DE VUYST, 2006). Neste estudo, a presença de ácidos orgânicos também inibiu fortemente bactérias Gram-positivas como é o caso da *Listeria monocytogenes* e do *Staphylococcus aureus*.

Entre as três cepas isoladas, o sobrenadante de AC-1 apresentou porcentagens de inibição significativas para todos os patógenos utilizados no teste e muito semelhantes à inibição causada pelos sobrenadantes das cepas referência.

Posteriormente, foram utilizadas as seis cepas mencionadas no item 3.4.5.1 e o estudo foi realizado em microplacas de ELISA. Os gráficos apresentados nas figuras 20 a 25 exibem a DO₆₃₀ real dos microrganismos patogênicos utilizados no teste e respectiva inibição pelos sobrenadantes tal qual (TQ).

FIGURA 20 – INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

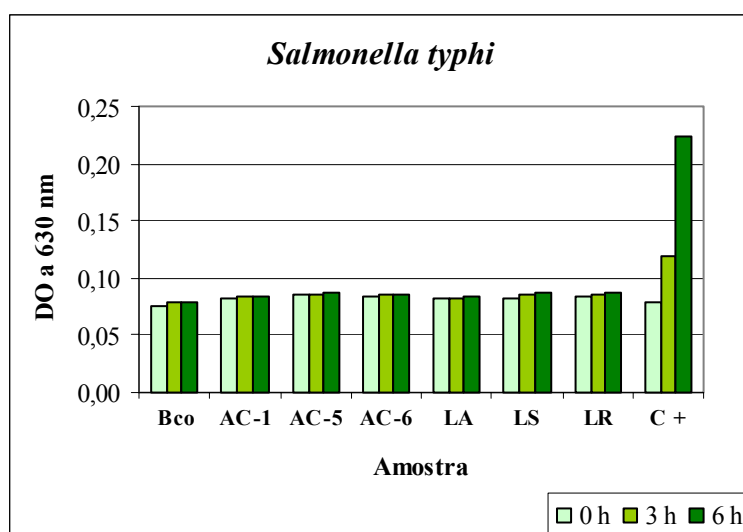


Observa-se na figura 20 que houve inibição do crescimento da *Escherichia coli* em todas as amostras TQ estudadas, em relação ao controle, tanto em 3 horas

como em 6 horas de incubação. A DO_{630} do branco se manteve constante em 0,074. Não houve diferença significativa nas porcentagens de inibição da *Escherichia coli* em 3 e em 6 horas de incubação. Em 3 horas de incubação a inibição ficou em torno de 96% e em 6 horas foi de 99% em média.

Na figura 21, verifica-se que também houve inibição do crescimento da *Salmonella typhi* em todas as amostras TQ estudadas, em relação ao controle, tanto em 3 horas como em 6 horas de incubação. A DO_{630} do branco sofreu um aumento negligenciável de 0,075 para 0,079. Não houve diferença significativa entre as amostras estudadas em 3 e 6 horas de incubação, sendo que as mesmas apresentaram porcentagens de inibição muito parecidas com os valores obtidos para a *Escherichia coli*. As porcentagens médias foram de 96% e 98% em 3 e 6 horas de incubação, respectivamente.

FIGURA 21 – INIBIÇÃO DE *Salmonella typhi* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



No gráfico da figura 22 observa-se que novamente houve inibição do crescimento da *Listeria monocytogenes* em todas as amostras TQ estudadas, em relação ao controle, tanto em 3 horas como em 6 horas de incubação. A DO_{630} do Branco permaneceu constante em 0,074. A maior porcentagem de inibição da *Listeria* em 3 horas de incubação foi de 100 % pelas cepas de *Lactobacillus sakei* (LS) e AC-1.

Após 6 horas, não houve diferença significativa entre as porcentagens de inibição de todas as amostras ficando uma média de 100%.

FIGURA 22 – INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

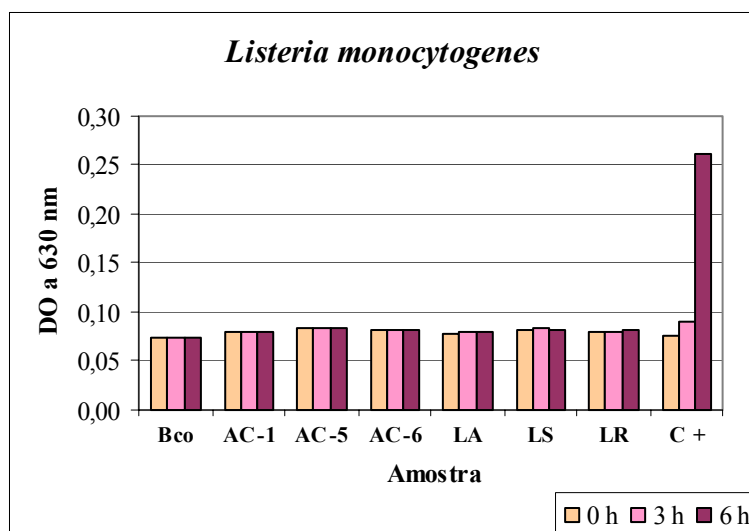
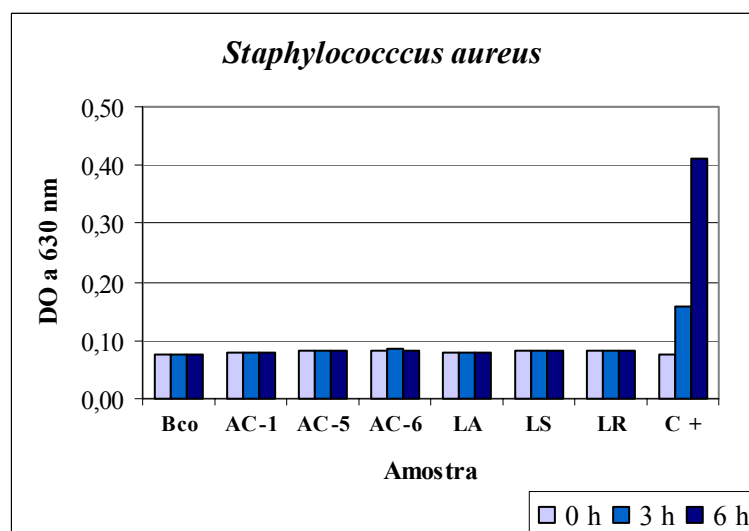


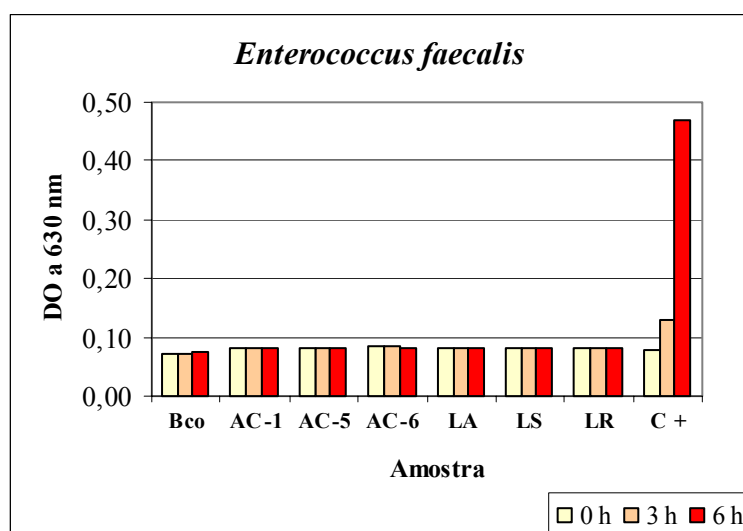
FIGURA 23 – INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Todos os sobrenadantes TQ estudados inibiram o crescimento do *Staphylococcus aureus* como se verifica na figura 23, tanto em 3 como em 6 horas de incubação. A DO_{630} do Branco se manteve aproximadamente constante em 0,075. Não houve diferença significativa na DO_{630} das amostras em 3 e 6 horas de incubação. As médias das percentagens de inibição do *Staphylococcus aureus* pelas amostras estudadas foi de 99% em 3 horas e 100% em 6 horas de incubação.

Na figura 24, observa-se que houve inibição do crescimento do *Enterococcus faecalis* em todas as amostras TQ estudadas, tanto em 3 horas como em 6 horas de incubação. A DO_{630} do Branco sofreu um aumento não significativo de 0,071 para 0,076 que provavelmente seja causa de erro analítico. Não houve diferença significativa entre as amostras estudadas em 3 e 6 horas de incubação. As percentagens médias de inibição do crescimento do *Enterococcus faecalis* foram de 100% em 3 e 6 horas de incubação.

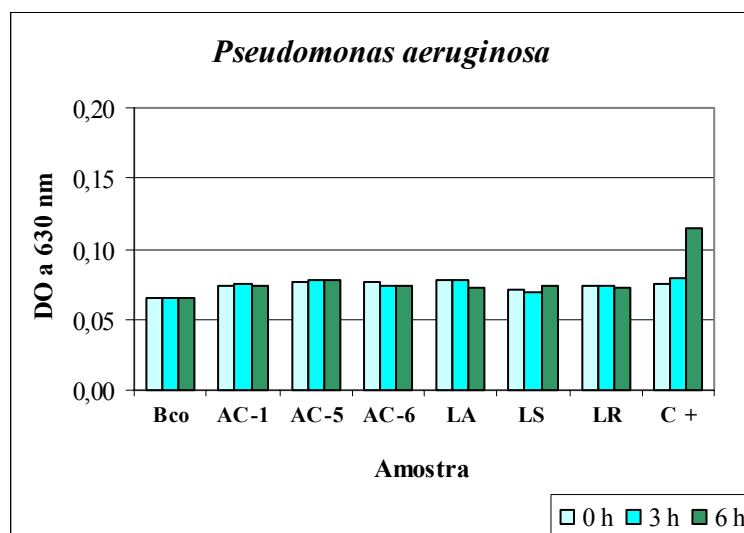
FIGURA 24 – INIBIÇÃO DE *Enterococcus faecalis* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Observa-se na figura 25 que houve inibição do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* pelas amostras TQ em 6 horas de incubação, em relação ao controle. O incremento da DO_{630} em 3 horas de incubação foi de apenas 0,004 para o controle,

portanto não se pode afirmar que houve inibição desta bactéria. A DO_{630} do Branco se manteve constante em 0,065. Em 6 horas de incubação a média foi de 99% de inibição.

FIGURA 25 – INIBIÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NÃO NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Todos os sobrenadantes TQ das amostras estudadas foram capazes de inibir fortemente os seis microrganismos patogênicos utilizados neste teste, com porcentagens de inibição muito próximas de 100%, confirmando a hipótese de que os ácidos orgânicos apresentam forte atividade inibitória, não só contra bactérias Gram-negativas como também contra patogênicos Gram-positivos.

Os gráficos apresentados nas figuras 26 a 31 exibem o aumento de DO_{630} dos microrganismos patogênicos testados e sua inibição pelos sobrenadantes neutralizados das amostras estudadas.

Observa-se na figura 26 que em 3 horas de incubação não houve inibição do crescimento da *Escherichia coli* por nenhuma das amostras N estudadas, em relação ao controle. Porém, em 6 horas de incubação, o sobrenadante N do *Lactobacillus acidophilus* (LA) inibiu o crescimento da *Escherichia coli* em 39%, seguido de AC-1 e *Lactobacillus sakei* (LS), ambos com 19% de inibição em relação ao controle.

FIGURA 26 – INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

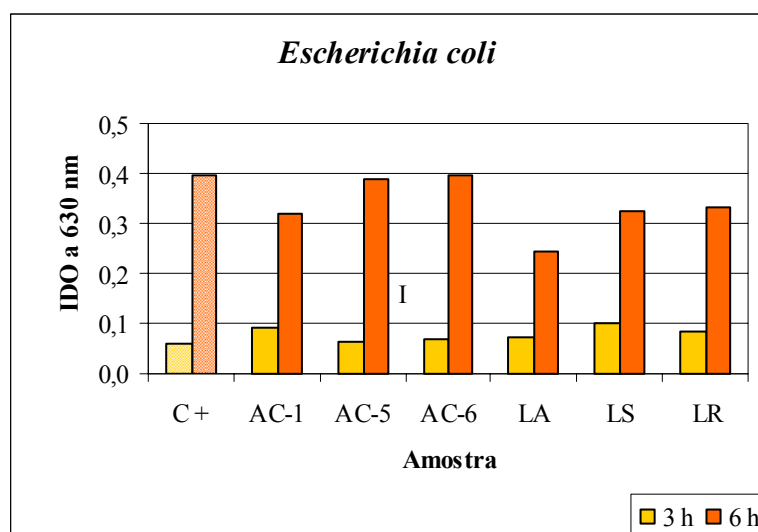
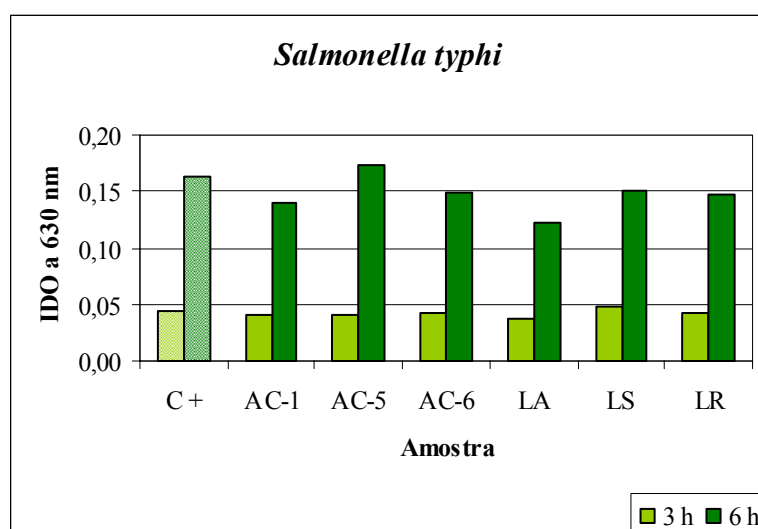


FIGURA 27 – INIBIÇÃO DE *Salmonella typhi* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Na figura 27, verifica-se que em 3 horas de incubação, a maior porcentagem de inibição da *Salmonella typhi* foi obtida com o sobrenadante N de LA (17%). Em 6 horas de incubação, novamente o sobrenadante N de LA inibiu em maior grau o crescimento da *Salmonella typhi* com 25% em relação ao controle, seguido do sobrenadante N de AC-1 com 14% de inibição.

Embora o incremento de DO_{630} da *Listeria monocytogenes* tenha sido baixo em 3 horas de incubação, de acordo com a figura 28, houve inibição de seu crescimento apenas pelas amostras AC-5 (36%) e AC-6 (17%). Após 6 horas de incubação, nenhum dos sobrenadantes das amostras estudadas foi capaz de inibir o crescimento da *L. monocytogenes*.

FIGURA 28 – INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

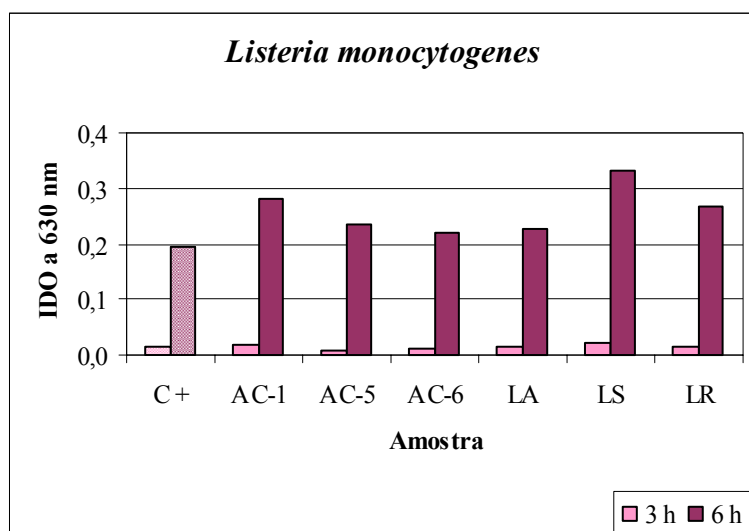
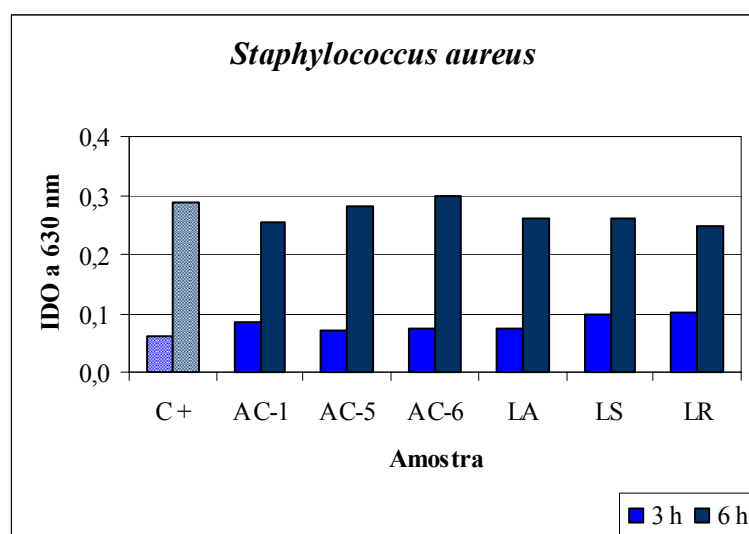


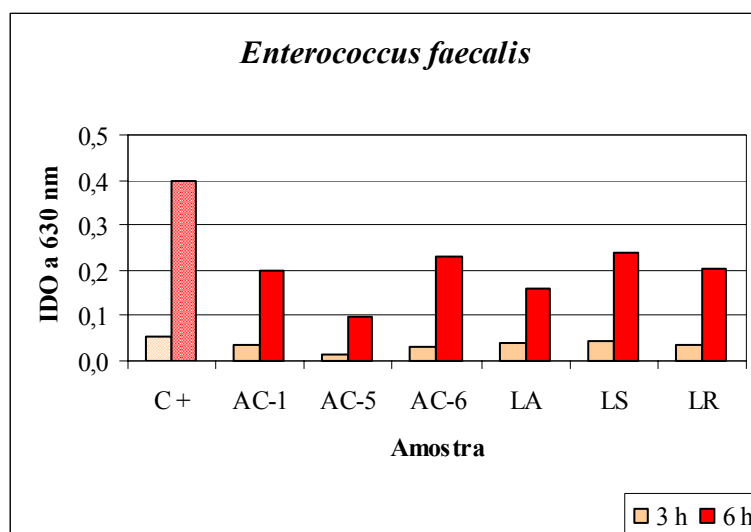
FIGURA 29 – INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Verifica-se na figura 29 que, em 3 horas de incubação, não houve inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* por nenhum dos sobrenadantes N estudados. Mas em 6 horas de incubação, o sobrenadante de LR foi capaz de inibir o patógeno em 14%, seguido de AC-1 com 12% de inibição em relação ao controle.

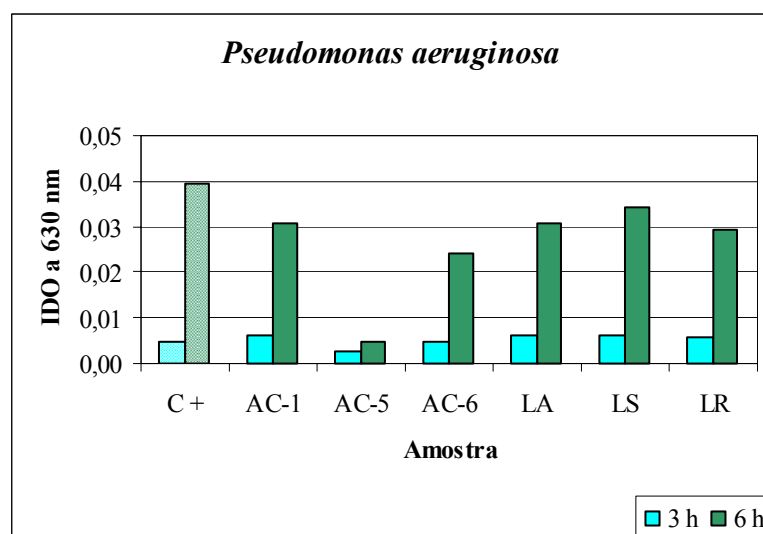
A figura 30 mostra que, tanto em 3 horas como em 6 horas de incubação, o *Enterococcus* foi inibido por todos os sobrenadantes N testados. A maior porcentagem de inibição nas primeiras 3 horas de incubação ocorreu com o sobrenadante da cepa AC-5 (76%), seguida de AC-6 com 41% e AC-1 com 30 % de inibição em relação ao controle. Em 6 horas de inibição, novamente o sobrenadante neutralizado da cepa AC-5 apresentou maior poder inibitório com 76%, seguido de LA e AC-1 com 60 e 50% de inibição, respectivamente.

FIGURA 30 – INIBIÇÃO DE *Enterococcus faecalis* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Observa-se na figura 31 que, em 3 horas de incubação, somente o sobrenadante N da amostra AC-5 inibiu o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* (43%). Porém, em 6 horas de incubação, todas as amostras N foram capazes de inibir o crescimento do microrganismo patogênico. O sobrenadante de AC-5 apresentou o maior poder inibitório com 88% em relação ao controle, seguido de AC-6 com 39% e LR com 26%.

FIGURA 31 – INIBIÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM MICROPLACAS PELOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS



Dos seis microrganismos patogênicos testados, após 6 horas de incubação, os sobrenadantes N das amostras estudadas foram capazes de causar maior inibição de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Entre as três cepas isoladas, o sobrenadante de AC-1 apresentou porcentagens de inibição semelhantes às aquelas causadas pelos sobrenadantes das cepas referência. Nos testes com *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*, as porcentagens de inibição do sobrenadante de AC-1 foram superiores às porcentagens de AC-5 e AC-6. Para *Listeria monocytogenes* não houve inibição por nenhum dos sobrenadantes neutralizados e, no caso do *Enterococcus* e da *Pseudomonas*, embora a porcentagem de inibição do sobrenadante de AC-5 tenha sido superior à AC-1, a porcentagem de inibição desta apresentou valores muito semelhantes aos das cepas referência.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a ação inibitória das bactérias lácticas contra patógenos Gram negativos, como *Escherichia coli* e *Salmonella*. Entre eles está o decréscimo do pH local pela produção de ácidos orgânicos, a competição por nutrientes, a competição por sítios de adesão, a estimulação da imunidade do hospedeiro e a produção de substâncias antibacterianas específicas (FULLER, 1989; MAKRAS e DE VUYST, 2006). Ácidos orgânicos como

o láctico e o acético possuem um forte efeito inibidor contra bactérias Gram negativas, mas poucos autores sugerem que a produção de ácidos orgânicos seja o único fator responsável pela atividade antagonista das bactérias lácticas. Inúmeras pesquisas sugerem que outras substâncias podem contribuir com esta atividade antagonista (FOOKS e GIBSON, 2002; SERVIN, 2004). O poder inibitório de algumas bactérias lácticas muitas vezes se deve a presença de bacteriocinas. Porém, muitas vezes, a atividade destas substâncias só é verificada após sua concentração e purificação parcial por precipitação com sulfato de amônio, seguida de diálise (MAKRAS e DE VUYST, 2006).

Pelos resultados dos testes de inibição de bactérias patogênicas, a cepa AC-1 foi escolhida por apresentar porcentagens de inibição relevantes na grande maioria dos casos e muito semelhantes à inibição causada pelos sobrenadantes das cepas referência. Além disso, entre as três cepas selecionadas, AC-5 e AC-6 produzem CO₂ que é uma característica indesejável na produção da bebida à base de água de coco.

4.3 COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS CEPAS SELECIONADAS PARA PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO

Foram selecionadas 3 diferentes culturas para serem utilizadas no preparo da bebida fermentada à base de água de coco. A cepa AC-1 (figura 32), que apresentou as melhores características probióticas entre as 7 cepas isoladas da microbiota do coco verde; a cepa B-7 (figura 33), obtida do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (UFPR) e produtora de exopolissacarídeo; e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BFL-9 (figura 34), obtido da empresa Danisco (França).

De acordo com as figuras 32 a 34, as cepas selecionadas são Gram positivas e todas se apresentam na forma de bacilos.

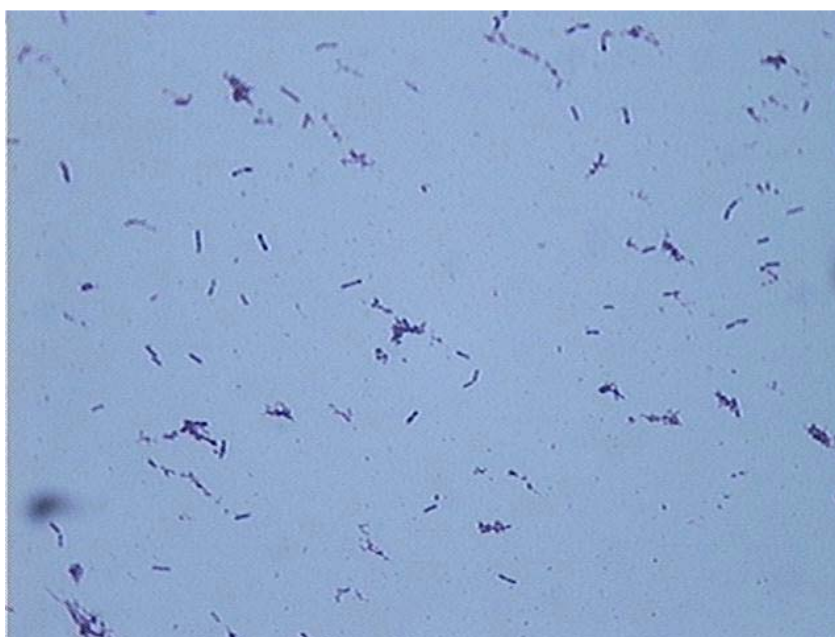
Na figura 32, observa-se que a morfologia da cepa AC-1 varia de acordo com as condições de cultivo. Quando cultivadas em aerobiose, as células se apresentam na forma de bastões mais curtos (figura 32a). Em anaerobiose, as células se apresentam mais alongadas (figura 32b).

FIGURA 32 – MICROSCOPIA ÓPTICA DA CEPA AC-1



NOTA: aumento de 1000 vezes. (a) cultivo em aerobiose e (b) cultivo em anaerobiose.

FIGURA 33 – MICROSCOPIA ÓPTICA DA CEPA B-7



NOTA: aumento de 1000 vezes. Cultivo em aerobiose.

A morfologia das células de BFL-9 varia um pouco em relação às cepas AC-1 e B-7. Os bacilos possuem extremidades mais largas e muitas células apresentam-se curvadas (figura 34). Os bastões irregulares são característicos das bactérias do gênero *Bifidobacterium* e são típicos por seus aspectos extremamente variáveis de uma espécie a outra (SGORBATI, BIAVATI e PALENZONA, 1995).

FIGURA 34 – MICRORSCOPIA ÓPTICA DA CEPA BFL-9

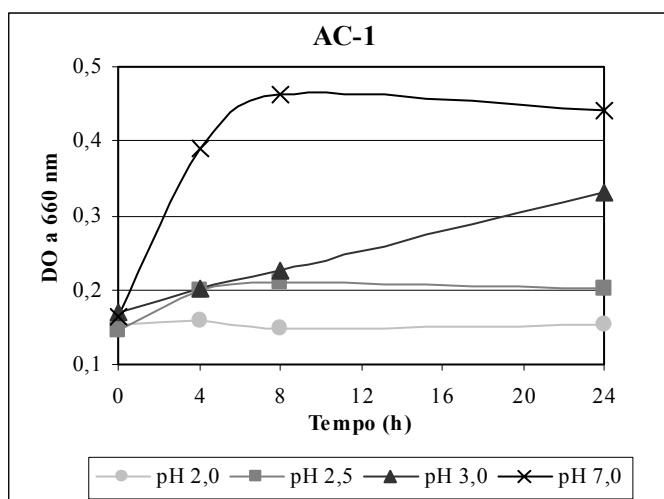


NOTA: aumento de 1000 vezes. Cultivo em anaerobiose

4.3.1 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Níveis de pH

A figura 35 mostra o perfil do crescimento da cepa AC-1 em caldo MRS com diferentes níveis de pH.

FIGURA 35 – CRESCIMENTO DE AC-1 EM CALDO MRS COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH

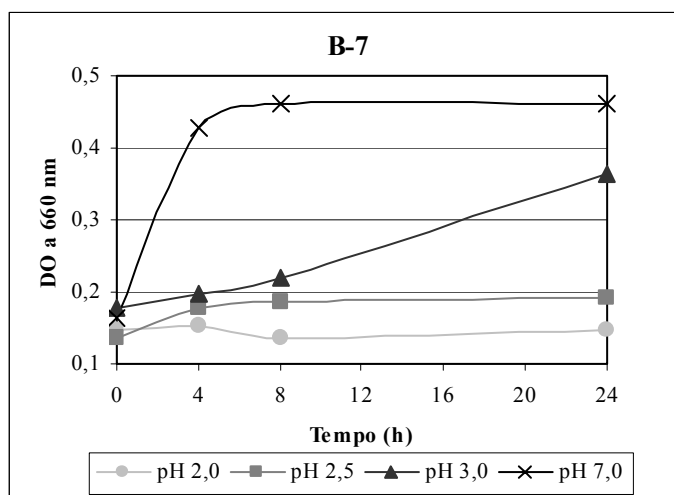


Observa-se que não houve crescimento da cepa em pH 2,0; houve baixo crescimento em pH 2,5, mas somente até 8 horas de incubação; e que em pH 3,0 o crescimento foi lento, mas crescente até as 24 horas de incubação. De acordo com a

figura 35, o pH ótimo para crescimento da cepa AC-1 fica em torno de 7,0 com o máximo de crescimento sendo atingido em torno de 7 horas de incubação a 37 °C.

Na figura 36 é apresentado o perfil de crescimento da cepa B-7 em diferentes níveis de pH. Neste caso também não houve crescimento da cepa em pH 2,0; o crescimento em pH 2,5 foi baixo e ocorreu até 8 horas de incubação; e em pH 3,0 o crescimento foi lento e crescente até 24 horas de incubação. Para a cepa B-7 o pH ótimo também foi em torno de 7,0 com o máximo de crescimento sendo atingido em torno de 6 horas de incubação a 37 °C. Nota-se que com 8 horas de incubação a cultura já atingiu a fase estacionária.

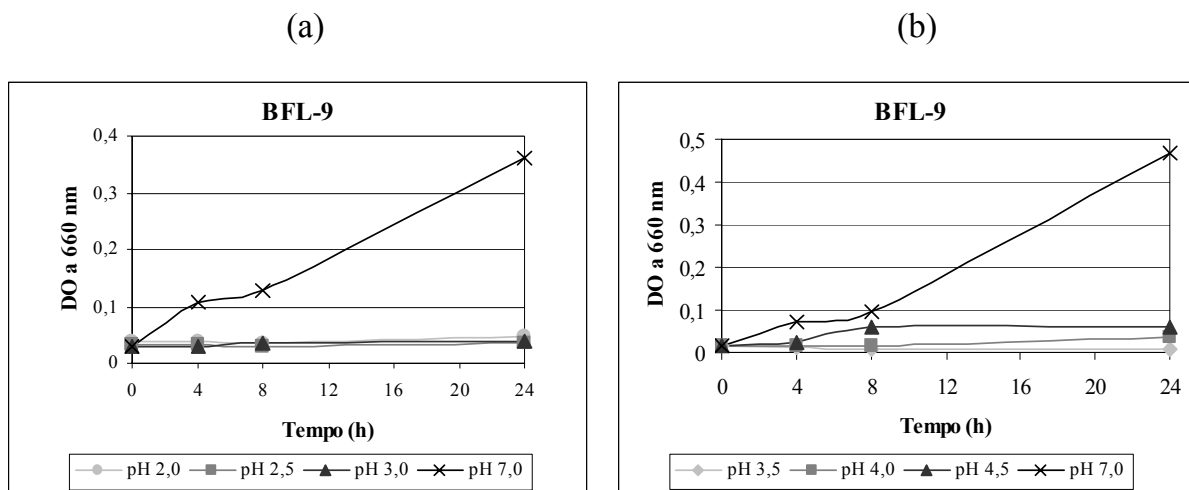
FIGURA 36 – CRESCIMENTO DE B-7 EM CALDO MRS COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH



O perfil de crescimento da cepa BFL-9 em diferentes níveis de pH é mostrado nas figuras 37 (a) e (b). Observa-se na figura 37a que não houve crescimento da cultura em nenhum dos pHs baixos testados. A cepa cresceu somente em pH 7,0 e mais lentamente do que as cepas de *Lactobacillus*. Portanto foram realizados novos testes com níveis de pH um pouco mais altos. Os resultados são mostrados na figura 37b. Observa-se que novamente não houve crescimento da cultura em pH 3,5, mas a partir do pH 4,0 já se percebe um pequeno crescimento da cepa. Em pH 4,5 o incremento de densidade óptica foi um pouco maior, mas ocorreu somente até 8 horas de incubação a 37 °C. A nova curva de crescimento de BFL-9 em pH 7,0 confirma o fato de que esta cepa cresce mais lentamente que os *Lactobacillus*, já que o

crescimento foi constante até 24 horas de incubação e ainda não havia atingido a fase estacionária.

FIGURA 37 – CRESCIMENTO DE BFL-9 EM CALDO RC COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH



Além dos testes de crescimento das cepas em diferentes pHs, foi realizado também um estudo para verificar a sobrevivência das mesmas durante 3 e 6 horas de exposição em baixos pHs em comparação com o crescimento em pH 7,0. Os resultados constam no quadro 3.

Em pH 7,0 verificou-se aumento da concentração celular das três cepas estudadas, enquanto que nos demais pHs ocorreu queda no número de células viáveis. O maior aumento na concentração celular ocorreu com a cepa AC-1 em 6 horas de incubação em pH 7,0, seguido de B-7 e BFL-9. Em pH 3,0 houve uma pequena redução no número de células das três cepas estudadas. Já em pH 2,5 e 2,0 essa queda foi mais acentuada. No caso da cepa BFL-9, a redução na concentração celular foi de quase 2 ciclos logarítmicos em 6 horas de exposição a pH 2,0.

QUADRO 3 – VIABILIDADE DE AC-1, B-7 E BFL-9 EM DIFERENTES NÍVEIS DE pH

Cepa	pH	Tempo de incubação (h)		
		0	3	6
AC-1	2,0	$2,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
	2,5	$2,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
	3,0	$2,5 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	7,0	$1,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$
B-7	2,0	$2,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$9,8 \times 10^7$
	2,5	$2,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
	3,0	$1,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
	7,0	$2,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
BFL-9	2,0	$1,0 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$
	2,5	$1,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$
	3,0	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
	7,0	$1,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$

NOTA: contagem de células em UFC/mL.

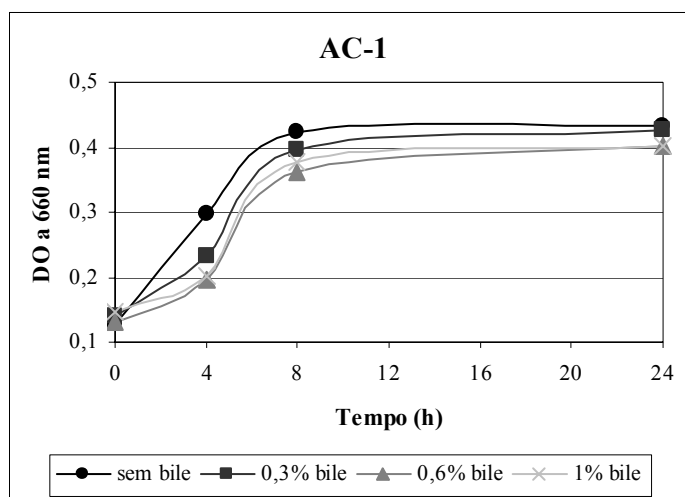
Segundo GISMONDO *et al.* (1999) e FIORAMONTI *et al.* (2003), para alcançar e colonizar o intestino, as bactérias têm que ser resistentes ao pH ácido do estômago. Uma das principais características dos probióticos é sua habilidade de sobreviver ao baixo pH estomacal (CONWAY *et al.*, 1987; PRASAD *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2006). Nota-se no quadro 3 que as três cepas estudadas foram capazes de sobreviver durante 6 horas em baixos níveis de pH mantendo quantidades significativas de células viáveis.

4.3.2 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de Sais Biliares

A figura 38 mostra o perfil do crescimento da cepa AC-1 em caldo MRS com diferentes concentrações de bile. O crescimento da cepa AC-1 foi superior na amostra sem adição de bile, mas ocorreu em todas as concentrações de bile testadas. Inclusive na amostra com adição de 1% de bile o crescimento foi superior à amostra com 0,6%, com valores de 0,377 e 0,363, respectivamente, após 8 horas de incubação. Nota-se que os valores de DO_{660} ficaram muito semelhantes após 24 horas de incubação a

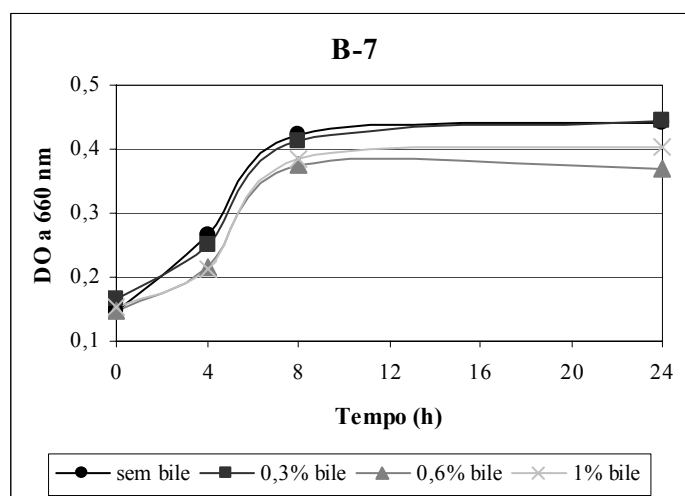
37 °C. Em todos os casos, o crescimento de AC-1 seguiu a mesma tendência e verificou-se aumento na DO_{660} até 8 horas de incubação. A partir daí a cultura atingiu a fase estacionária.

FIGURA 38 – CRESCIMENTO DE AC-1 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE



A figura 39 mostra o crescimento celular de B-7 em diferentes concentrações de bile.

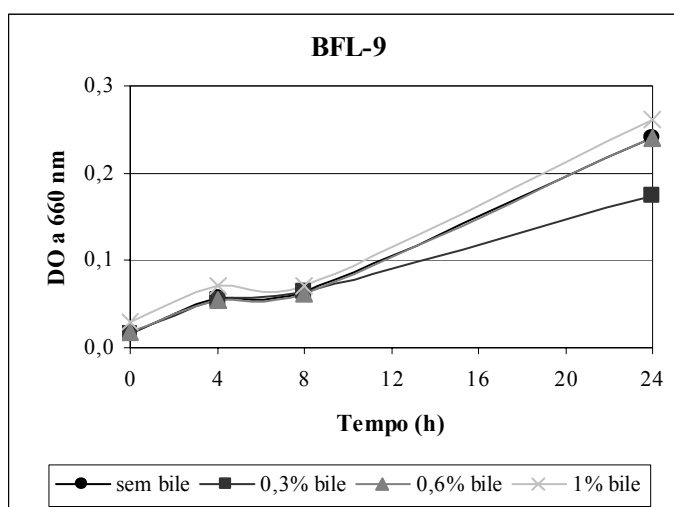
FIGURA 39 – CRESCIMENTO DE B-7 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE



De acordo com a figura 39, não houve diferença significativa no crescimento da cepa B-7 em MRS sem adição de bile ou com adição de 0,3%. Houve crescimento da cepa em todas as concentrações de bile testadas. Na amostra com adição de 1% de bile, o crescimento de B-7 também foi superior à amostra com 0,6%, atingindo valores de 0,384 e 0,374, respectivamente, após 8 horas de incubação. Nota-se que não houve diferença no crescimento da cepa depois de 24 horas de incubação a 37 °C nas amostras sem adição de bile e com 0,3% de bile e que a DO_{660} foi maior com 1% de bile em relação à amostra com 0,6% de bile. O crescimento de B-7 em todos os casos seguiu a mesma tendência e verificou-se aumento na DO_{660} até 8 horas de incubação. A partir daí a cultura atingiu a fase estacionária.

Na figura 40 é apresentado o crescimento celular de BFL-9 em diferentes concentrações de bile. Observa-se que houve crescimento da cultura em todas as concentrações de bile testadas até 24 horas de incubação a 37 °C. Verifica-se que o incremento na DO_{660} não é proporcional ao aumento da concentração de bile, já que o maior valor foi atingido em meio adicionado de 1% de bile, seguidos de 0%, 0,6% e por último 0,3% de bile. Neste caso a adição de 1% de bile ao meio de cultivo foi benéfica ao crescimento de BFL-9 em 24 horas de incubação.

FIGURA 40 – CRESCIMENTO DE BFL-9 EM CALDO RC COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE



Foi realizado também um estudo para verificar a sobrevivência das cepas durante 3 e 6 horas de exposição nas diferentes concentrações de bile e os resultados comparados com o crescimento em caldo sem adição de bile. Os resultados são apresentados no quadro 4.

QUADRO 4 – VIABILIDADE DE AC-1, B-7 E BFL-9 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BILE

Cepa	Concentração de bile (%)	Tempo de incubação (h)		
		0	3	6
AC-1	0	$1,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$
	0,3	$1,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
	0,6	$1,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
	1,0	$1,4 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
B-7	0	$1,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$
	0,3	$1,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	0,6	$1,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
	1,0	$1,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
BFL-9	0	$6,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
	0,3	$4,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
	0,6	$7,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	1,0	$6,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$

NOTA: contagem de células em UFC/mL.

Conforme apresentado no quadro 4, em caldo sem adição de bile ocorreu o crescimento de todas as cepas em 3 e 6 horas de incubação. O maior aumento no número de células com o tempo foi verificado para a cepa AC-1, seguida de BLF-9 e de B-7. Com adição de 0,3% e 0,6% de bile o maior aumento da concentração celular ocorreu com a cepa BFL-9, seguida de AC-1 e B-7, tanto em 3 como em 6 horas de incubação. Em concentração de 1% de bile, o maior aumento na concentração de células ocorreu com a cepa BFL-9 com 3 horas de incubação, seguida de B-7 e AC-1. Apenas a cepa BFL-9 foi capaz de crescer em 6 horas de incubação na presença de 1% de bile, o que não ocorreu com as cepas B-7 e AC-1. No caso da cepa AC-1, o aumento da concentração celular é inversamente proporcional ao aumento na

concentração de bile, sendo que esta influencia negativamente no crescimento da cepa. O mesmo não se confirma para a cepa B-7. Em 3 horas de incubação seu melhor crescimento foi com 1% de bile e em 6 horas foi sem adição de bile seguida de 1% de bile.

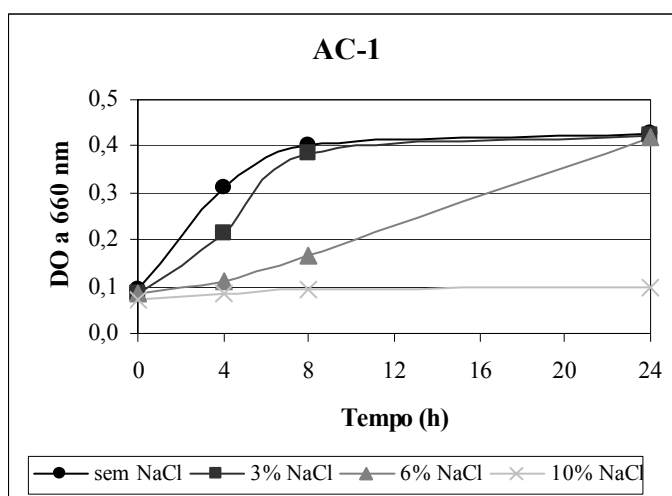
Os resultados mostrados na figura 40 e no quadro 4 indicam que a adição de bile ao meio estimula o crescimento da cepa BFL-9. Pelos valores do quadro 4, o maior incremento de densidade óptica de BFL-9 ocorreu com 0,3% de bile, seguida de 0%, 1,0% e 0,6%. O aumento da concentração celular da cepa também não foi proporcional ao aumento na concentração de bile. Sendo assim, os dados do quadro 4 não seguiram a mesma tendência observada na figura 40. De qualquer forma, a adição de bile ao meio de cultivo de BFL-9 não apresentou efeito negativo no crescimento da cepa.

Outra característica importante das culturas probióticas é sua resistência aos sais biliares para que possam aderir às paredes intestinais (GISMONDO *et al.*, 1999; FIORAMONTI *et al.*, 2003). Na seleção de bactérias probióticas para uso humano têm sido utilizadas concentrações em torno de 0,3% de bile (CHOU e WEIMER, 1999; PRASAD *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2006). Observa-se no quadro 4 que as três cepas estudadas foram capazes de sobreviver durante 6 horas em concentrações consideráveis de bile mantendo elevada viabilidade celular.

4.3.3 Crescimento e Sobrevivência das Cepas em Diferentes Concentrações de NaCl

A figura 41 mostra o perfil do crescimento da cepa AC-1 em caldo MRS com diferentes concentrações de NaCl. Observa-se que não houve crescimento da cepa em meio com 10% de NaCl. Em meio com concentração de 6% de NaCl o crescimento foi lento, mas crescente até as 24 horas de incubação a 37 °C. O crescimento de AC-1 em presença de 3 % de NaCl seguiu a mesma tendência do crescimento em meio sem NaCl e após 8 horas de incubação atingiram valores de densidade óptica muito semelhantes. Nestas duas condições, a cepa atinge a fase estacionária com 8 horas de incubação.

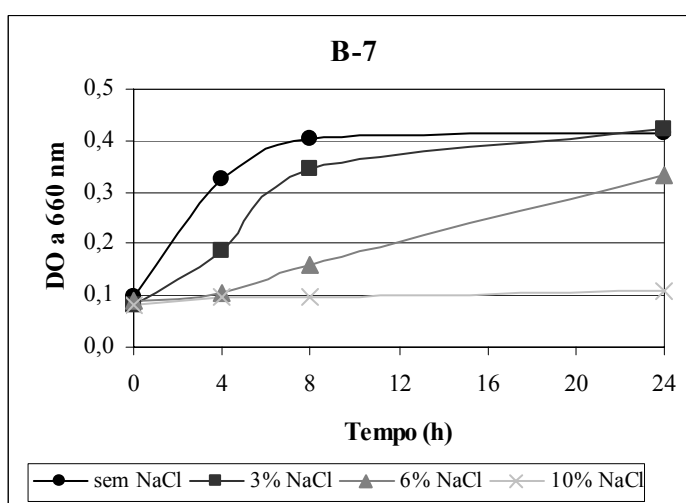
FIGURA 41 – CRESCIMENTO DE AC-1 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl



Com exceção da curva com 10% de NaCl, não houve diferença significativa nos valores de densidade óptica de AC-1 nas demais concentrações em 24 horas de incubação (figura 41).

Na figura 42 é apresentado o perfil de crescimento da cepa B-7 em diferentes concentrações de NaCl.

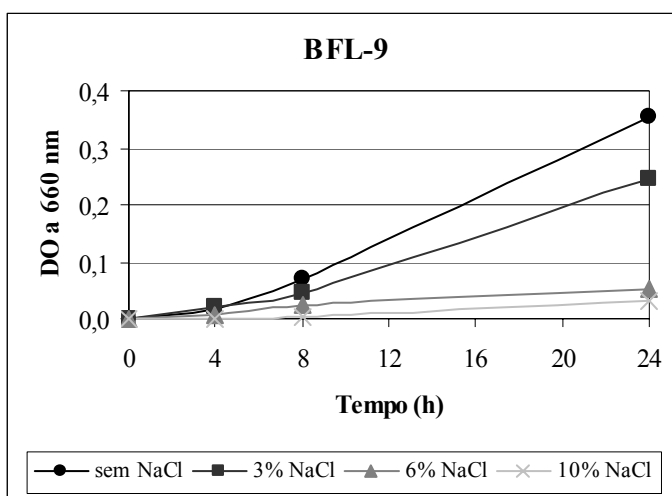
FIGURA 42 – CRESCIMENTO DE B-7 EM CALDO MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl



O crescimento da cepa B-7, em presença de 3 % de NaCl, seguiu a mesma tendência do crescimento em meio sem NaCl, embora os valores de densidade óptica foram menores em meio com 3% de NaCl. Nestas duas condições, não houve diferença entre os valores de densidade óptica de B-7 em 24 horas de incubação. Sem adição de NaCl, a cultura atingiu a fase estacionária em 8 horas de incubação a 37 °C. O crescimento em concentração de 6% de NaCl foi lento e ocorreu até 24 horas de incubação. Em caldo com 10% de NaCl também não houve crescimento da cepa B-7 (figura 42).

Na figura 43 é apresentado o crescimento celular de BFL-9 em diferentes concentrações de NaCl. Observa-se que houve crescimento da cultura em todas as concentrações de NaCl testadas, embora nos meios com 10% e 6% de NaCl o incremento de densidade óptica de BFL-9 tenha sido baixo. O crescimento da cepa foi contínuo durante todo o ensaio e até as 24 horas de incubação ainda não havia atingido a fase estacionária em nenhuma das condições testadas. Mesmo em 24 horas de incubação, os valores de densidade óptica foram bem diferentes nos meios sem NaCl e com adição de 3% de NaCl, chegando a 0,356 e 0,245, respectivamente. Este fato mostra que a cepa BLF-9 é mais sensível à presença de NaCl do que as demais cepas testadas.

FIGURA 43 – CRESCIMENTO DE BFL-9 EM CALDO RC COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl



Na sequência, foi realizado um estudo para verificar a sobrevivência das cepas em diferentes concentrações de NaCl durante 3 e 6 horas de incubação. Os resultados foram comparados com o crescimento em caldo sem adição de NaCl e são mostrados no quadro 5.

QUADRO 5 – VIABILIDADE DE AC-1, B-7 E BFL-9 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl

Cepa	Concentração de NaCl (%)	Tempo de incubação (h)		
		0	3	6
AC-1	0	$1,9 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$
	3	$1,7 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$
	6	$1,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
	10	$2,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
B-7	0	$2,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
	3	$2,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
	6	$2,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
	10	$2,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
BFL-9	0	$8,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
	3	$2,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$
	6	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
	10	$2,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$

NOTA: contagem de células em UFC/mL.

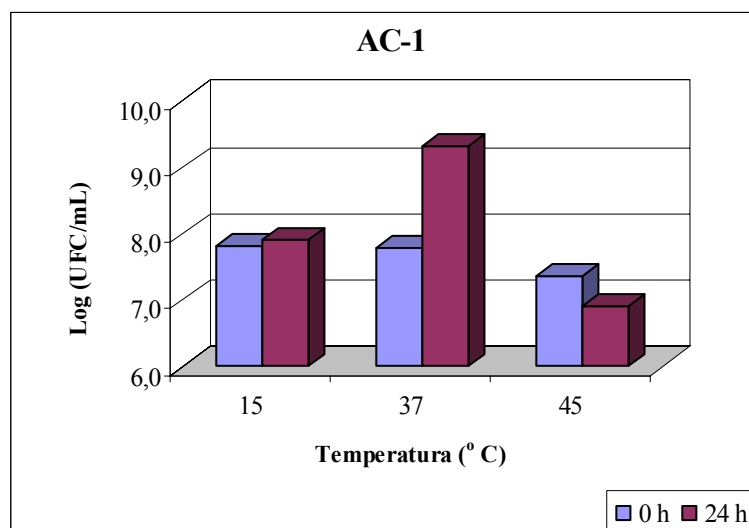
Os resultados do quadro 5 mostram que em caldo sem adição de NaCl ocorreu o crescimento de todas as cepas testadas sendo que o maior aumento no número de células com o tempo foi verificado para a cepa AC-1, seguida de B-7 e de BLF-9. Com adição de 3% de NaCl, em 6 horas de incubação, o maior aumento da concentração celular ocorreu com a cepa B-7, seguida de AC-1 e BFL-9. Com adição de 6% de NaCl, apenas as cepas AC-1 e B-7 foram capazes de crescer. Neste caso, houve uma pequena redução na concentração de células vivas de BFL-9. Em concentração de 10% de NaCl, houve queda no número de células viáveis de AC-1 e BFL-9, sendo que desta última a redução foi mais acentuada. No caso da cepa B-7, houve um pequeno aumento no número de células vivas em 3 horas, seguida de pequena queda com 6

horas de incubação. No caso da cepa AC-1, o aumento na concentração de NaCl é inversamente proporcional ao aumento da concentração celular, tanto em 3 como em 6 horas de incubação. Este fato se confirma para B-7 e BFL-9 apenas em 6 horas.

4.3.4 Crescimento das Cepas em Diferentes Temperaturas

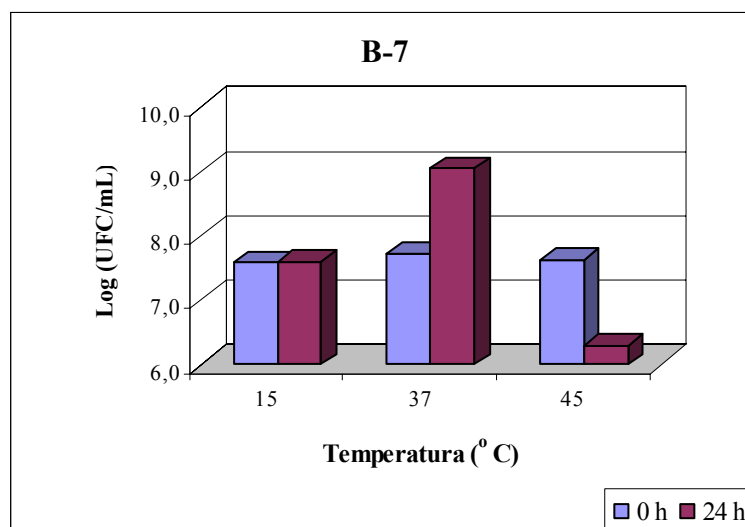
A figura 44 mostra o crescimento da cepa AC-1 sob temperaturas de 15, 37 e 45 °C. Houve um bom crescimento da cepa em temperatura de 37 °C (1,54 ciclos logarítmicos), mas a 15 °C o crescimento foi baixo e a 45 °C houve inclusive redução no número de células viáveis.

FIGURA 44 – CRESCIMENTO DA CEPA AC-1 EM DIFERENTES TEMPERATURAS



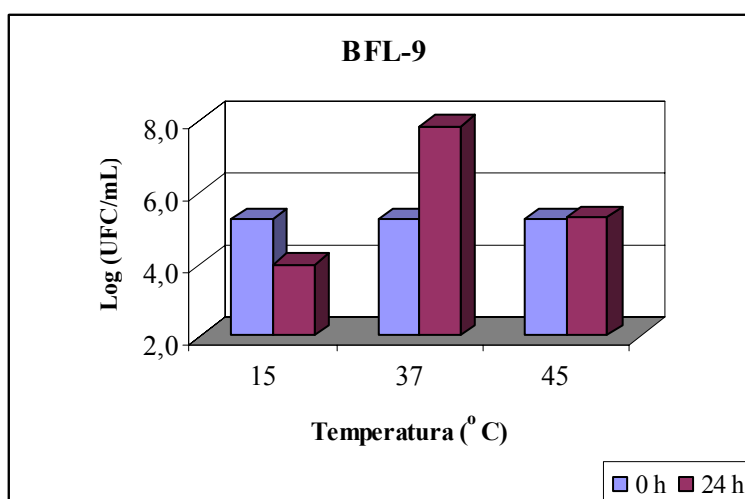
Na figura 45 é apresentado o crescimento da cepa B-7 nas mesmas temperaturas. Houve bom crescimento da cepa em temperatura de 37 °C (1,32 ciclos logarítmicos), porém menor que AC-1. Em 15 °C o crescimento foi muito pequeno, mas também inferior ao crescimento de AC-1. Em 45 °C houve uma considerável redução na contagem de células, superior à redução verificada para AC-1. Assim, a cepa B-7 é mais sensível a extremos de temperatura que a cepa AC-1.

FIGURA 45 – CRESCIMENTO DA CEPA B-7 EM DIFERENTES TEMPERATURAS



A figura 46 mostra o crescimento da cepa BFL-9 em temperaturas de 15, 37 e 45 °C. O crescimento da cepa em temperatura de 37 °C foi superior às demais cepas (2,6 ciclos logarítmicos) e, ao contrário delas, em temperatura de 15 °C houve redução no número de células viáveis de BFL-9 e em 15 °C, apesar de pequeno, houve crescimento da cepa.

FIGURA 46 – CRESCIMENTO DA CEPA BFL-9 EM DIFERENTES TEMPERATURAS



De acordo com as figuras 44 a 46, as cepas AC-1 e B-7 são capazes de crescer e se adaptar bem em temperaturas inferiores a 37 °C (até 15 °C), enquanto a cepa BFL-

9 pode crescer bem em temperaturas superiores a 37 °C (até 45 °C). Além disso, os resultados de crescimento em diferentes temperaturas e os resultados de estudos anteriores, de crescimento em diferentes pHs e em presença de bile e NaCl, confirmaram o fato de que a cepa BFL-9 apresenta um ótimo crescimento, porém é mais lento que de AC-1 e B-7.

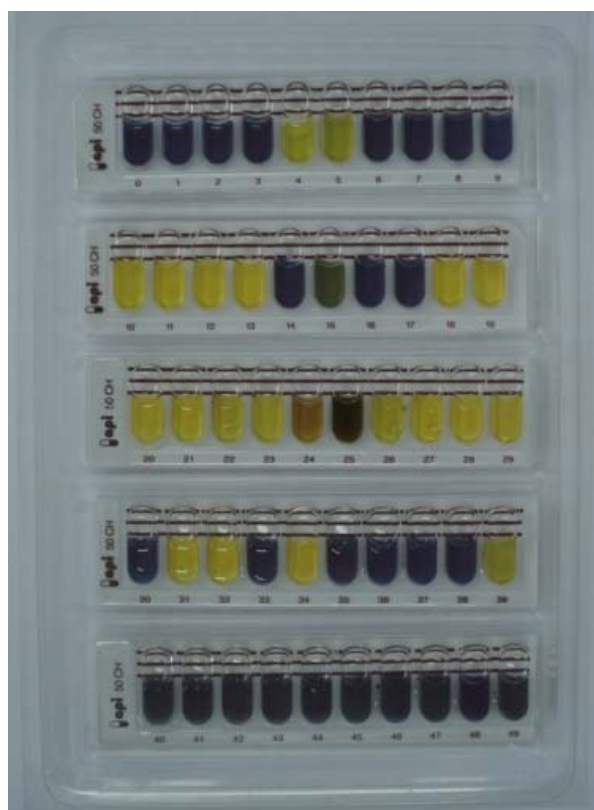
4.3.5 Provas Bioquímicas de Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono

A figura 47 mostra o perfil bioquímico do consumo de várias fontes de carbono pelas cepas estudadas, onde os componentes consumidos aparecem em amarelo e os não consumidos em azul.

FIGURA 47 – PERFIL BIOQUÍMICO DA FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO PELAS CULTURAS AC-1 E B-7

AC-1

B-7



A relação das fontes de carbono fermentadas ou não pelas cultura AC-1 e B-7 é apresentada no quadro 6, onde amarelo é positivo (+), azul é negativo (-) e verde é variável (\pm). De acordo com este perfil e com o programa APILAB PLUS versão 5.1 (BioMérieux, França), a cepa AC-1 foi caracterizada como *Lactobacillus plantarum* tipo 1 e a cepa B-7 como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* tipo 1.

QUADRO 6 – RELAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO FERMENTADAS OU NÃO PELAS CEPAS AC-1 E B-7

Tubo	Componente Ativo	AC-1	B-7	Tubo	Componente Ativo	AC-1	B-7
0	Controle	-	-	26	Salicina	+	+
1	Glicerol	-	-	27	D-Celobiose	+	+
2	Eritritol	-	-	28	D-Maltose	+	+
3	D-Arabinose	-	-	29	D-Lactose	+	+
4	L-Arabinose	+	-	30	D-Melibiose	-	-
5	D-Ribose	+	+	31	D-Sacarose	+	\pm
6	D-Xilose	-	-	32	D-Trealose	+	+
7	L-Xilose	-	-	33	Inulina	-	-
8	D-Adonitol	-	+	34	D-Melezitose	+	-
9	Metil- β D-Xilopiranosido	-	-	35	D-Rafinose	-	-
10	D-Galactose	+	+	36	Amido	-	-
11	D-Glicose	+	+	37	Glicogênio	-	-
12	D-Fructose	+	+	38	Xilitol	-	-
13	D-Manose	+	+	39	Gentibiose	+	+
14	L-Sorbose	-	+	40	D-Turanose	-	+
15	L-Ramnose	\pm	-	41	D-Lixose	-	-
16	Dulcitol	-	-	42	D-Tagatose	-	+
17	Inositol	-	\pm	43	D-Fucose	-	-
18	D-Manitol	+	+	44	L-Fucose	-	-
19	D-Sorbitol	+	+	45	D-Arabitól	-	-
20	Metil- α D-Manopiranosido	+	-	46	L-Arabitól	-	-
21	Metil- α D-Glucopiranosido	+	\pm	47	Gluconato de potássio	-	\pm
22	N-Acetilglucosamina	+	+	48	2-Cetogluconato de potássio	-	-
23	Amigdalina	+	+	49	5-Cetogluconato de potássio	-	-
24	Arbutina	+	+				
25	Esculina citrato de ferro	+	+				

Com o objetivo de confirmar o gênero e espécie das cepas, estas foram conduzidas à identificação molecular.

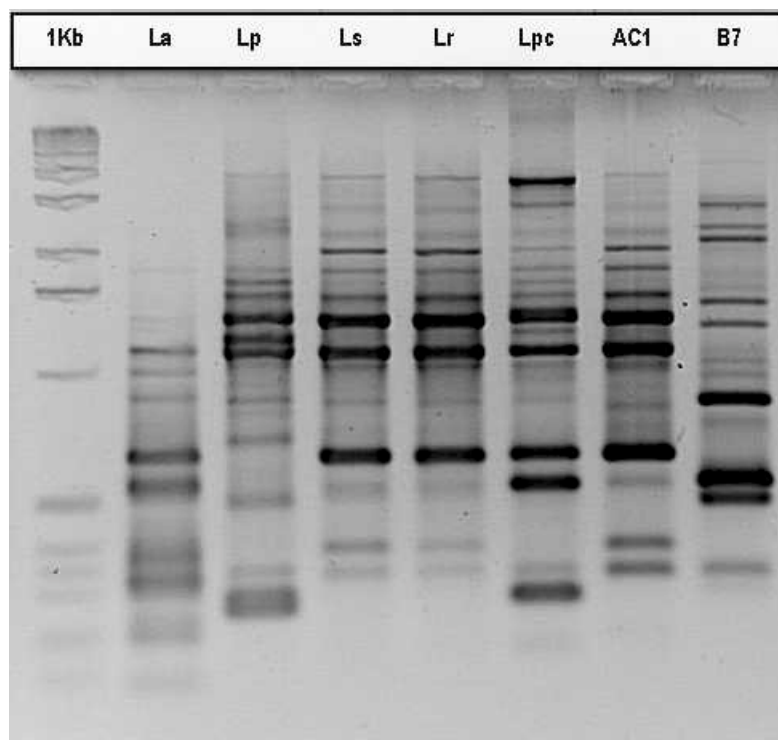
4.3.6 Identificação Molecular das Cepas

Os testes de identificação molecular das culturas AC-1 e B-7 foram realizados de acordo com o item 3.5.6. As figuras 48 a 50 mostram o perfil de

RAPD-PCR do DNA das culturas utilizando os três diferentes *primers* apresentados na tabela 10.

Observa-se na figura 48 que utilizando o *primer* COC ocorreu grande número de pareamentos das bandas da cultura AC-1 com as bandas de *L. sakei* e *L. rhamnosus* e que houve poucos pareamentos das bandas da cultura B-7 com as culturas testadas.

FIGURA 48 – PERFIL DE RAPD-PCR OBTIDO COM O *PRIMER* COC

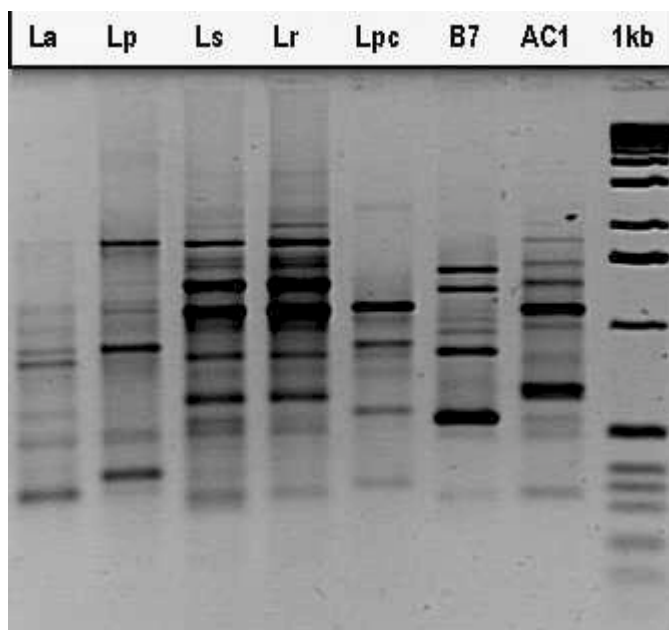


NOTA: Linha 1: marcador de peso molecular de 1 kb, linhas 2 a 6: DNA de *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei*

Na figura 49 foi utilizado o *primer* M13. Neste caso o maior número de pareamentos das bandas de AC-1 também foi com *L. sakei* e *L. rhamnosus* e novamente houve poucas bandas de B-7 que parearam com as culturas testadas.

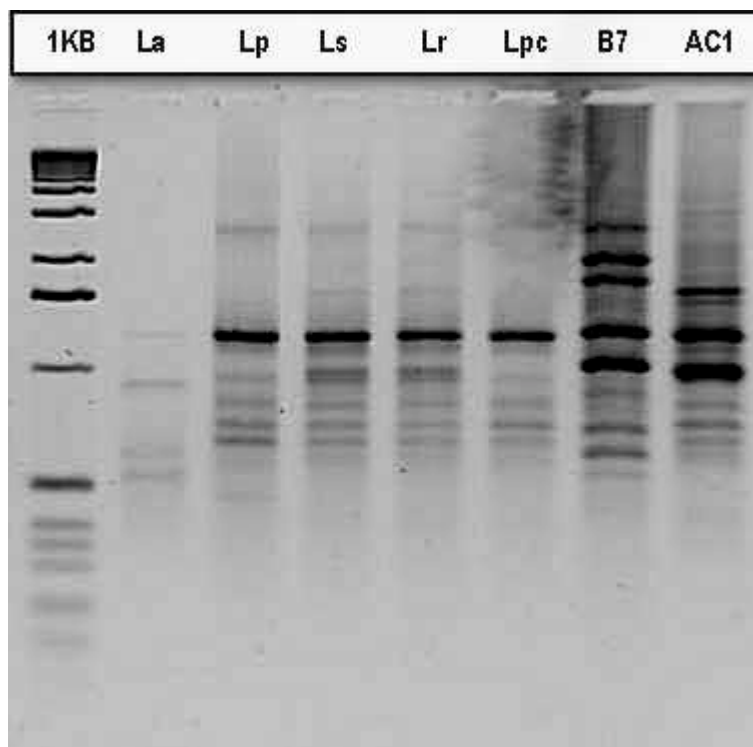
Na figura 50, em que foi utilizado o *primer* M14, verifica-se claramente a presença de uma banda mais escura, comum a todas as culturas testadas. Neste caso as demais bandas das cepas referência ficaram muito claras.

FIGURA 49 – PERFIL DE RAPD-PCR OBTIDO COM O PRIMER M13



NOTA: Linhas 1 a 5: DNA de *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, linha 8: marcador de peso molecular de 1 kb

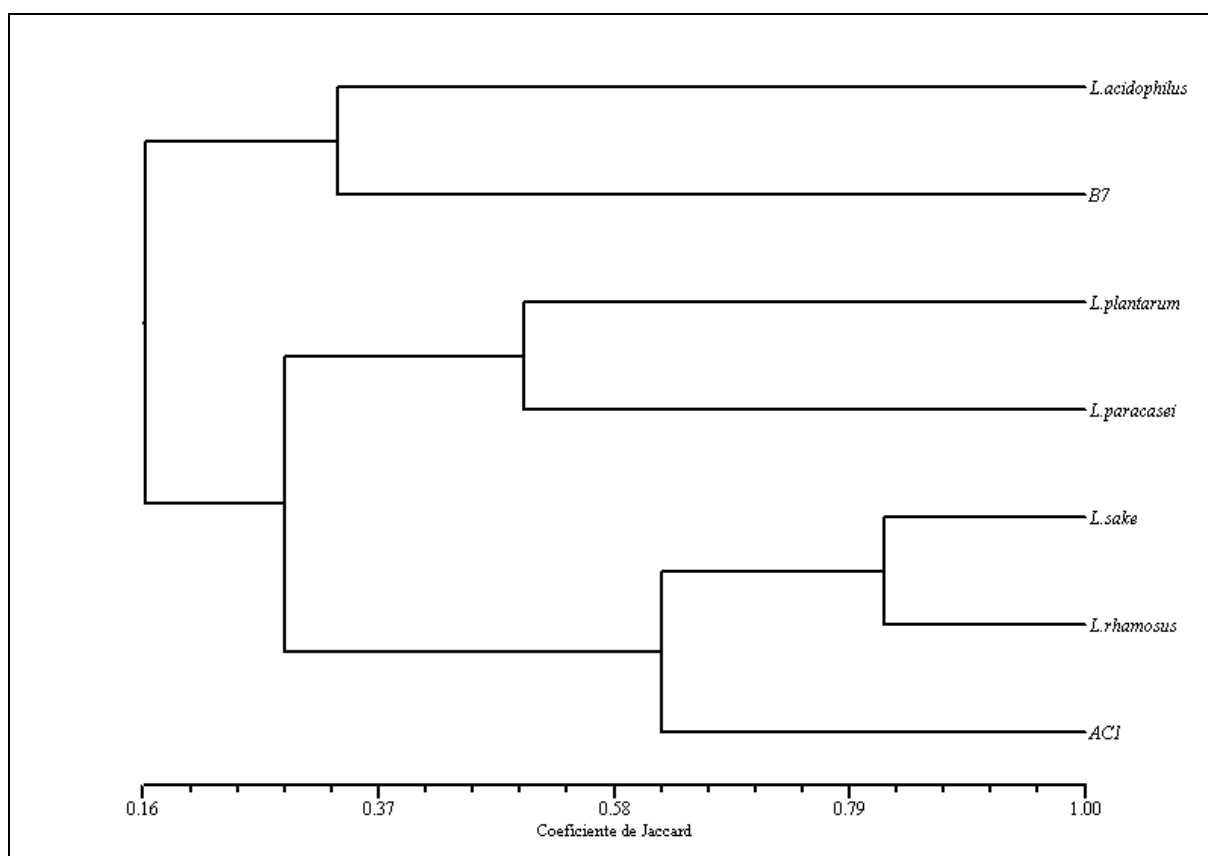
FIGURA 50 – PERFIL DE RAPD-PCR OBTIDO COM O PRIMER M14



NOTA: Linha 1: marcador de peso molecular de 1 kb, linhas 2 a 6: DNA de *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei*

Com os resultados dos três perfis apresentados foi gerado um dendrograma (figura 51). Observa-se que a maior porcentagem de similaridade ocorreu entre as culturas *L. sakei* e *L. rhamnosus* (82,4%). O perfil de AC-1 foi mais semelhante a estas duas culturas com similaridade de apenas 62,7%. A cultura B-7 apresentou pouquíssima similaridade com as cepas referência. Foi similar ao *L. acidophilus* em apenas 35%.

FIGURA 51 – DENDROGRAMA DERIVADO DOS PERFIS DE RAPD-PCR UTILIZANDO OS PRIMERS COC, M13 E M14.



Em nível de espécie, os resultados foram bem diferentes daqueles obtidos nas provas bioquímicas de fermentação de diferentes carboidratos (item 4.3.5).

CORSETTI *et al.* (2001) analisaram 317 supostas bactérias lácticas isoladas de fermentos utilizando galerias API 50 CH (BioMérieux). Somente 38% foram identificadas em nível de espécie. Um experimento semelhante foi utilizado para

identificar 113 bactérias lácticas isoladas de uma bebida fermentada tradicional na Uganda. O uso combinado de dois diferentes kits de fermentação de carboidratos permitiu a identificação de apenas 14 bactérias lácticas em nível de espécie (WIJTZES *et al.*, 1997). Estes estudos demonstram que os métodos fenotípicos têm suas limitações devido à pouca reprodutibilidade e à resolução taxonômica relativamente baixa, permitindo a diferenciação somente em nível de gênero. Quando um isolado desconhecido tem que ser identificado, uma ferramenta poderosa e altamente eficiente é sequenciar os fragmentos 16S do rDNA. As seqüências obtidas são comparadas com seqüências de DNA armazenadas em bancos de dados on-line. Os mais conhecidos são o EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) e o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) (TEMMERMAN *et al.*, 2004).

4.3.7 Detecção de Isômeros de Ácido Láctico

A quantificação dos isômeros de ácido láctico produzidos pelas cepas AC-1 e B-7 foram comparados aos isômeros produzidos por uma cepa referência muito utilizada em bebidas probióticas, o *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (LA). Os resultados aparecem no quadro 7.

QUADRO 7 – PORCENTAGEM DOS ISÔMEROS D- E L-ÁCIDO LÁCTICO PRODUZIDOS PELAS CULTURAS AC-1, B-7 E *Lactobacillus acidophilus*

Cepa	D-ácido láctico (g/L)	L-ácido láctico (g/L)	D-ácido láctico (%)	L-ácido láctico (%)
AC-1	6,10	6,50	48	52
B-7	1,15	10,33	10	90
LA	6,77	6,54	51	49

Nota-se que as três cepas produzem D- e L-ácido láctico. AC-1 e o *L. acidophilus* produzem praticamente metade de cada um, enquanto a cepa B-7 produz uma quantidade muito maior de L-ácido láctico (90%). Sendo assim, pode-se afirmar que AC-1 e LA produzem DL ácido láctico, enquanto B-7 produz prioritariamente o isômero L-ácido láctico.

4.3.8 Resistência à Antibióticos

Na tabela 19 são apresentadas as medidas dos halos de inibição das cepas AC-1, B-7 e BFL-9 formados pela presença de diferentes antibióticos. As três cepas estudadas apresentaram boa resistência à gentamicina e à cefalexina. Com exceção da gentamicina, percebe-se que houve maior inibição de BFL-9, seguida de B-7 e AC-1 (tabela 19) para todos os antibióticos testados. Entre as cepas avaliadas, AC-1 é a mais resistente aos antibióticos estudados, seguida de B-7 e de BFL-9.

Uma das características essenciais dos probióticos é que eles devem apresentar resistência aos antibióticos (GISMONDO *et al.*, 1999; FIORAMONTI *et al.*, 2003). Genes que conferem resistência à tetraciclina, eritromicina e vancomicina têm sido detectados e caracterizados em *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* e recentemente em espécies de *Lactobacillus* isoladas de salames e produtos lácteos (MATHUR e SINGH, 2005).

TABELA 19 – SENSIBILIDADE DAS CEPAS ESCOLHIDAS FRENTE À DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Cepa		
	AC-1	B-7	BFL-9
Amoxicilina	22	25	>35
Cefalexina	13	19	28
Cloranfenicol	21	26	>35
Eritromicina	18	25	>35
Gentamicina	11	13	10
Lincomicina	24	34	>35
Penicilina G	16	32	>35

NOTA: medida dos halos de inibição em mm

4.4 PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO

4.4.1 Testes de Crescimento com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio

De acordo com a tabela 1, a água de coco *in natura* apresenta, em média, 37 mg de proteínas por litro. Devido a essa baixa quantidade de proteínas, faz-se necessário a adição de alguma fonte extra de nitrogênio para se obter maior concentração celular em menor tempo de fermentação, durante a produção da bebida fermentada.

O desenvolvimento inicial da bebida fermentada à base de água de coco foi realizado utilizando apenas a cepa AC-1, a qual foi selecionada entre sete cepas isoladas da microbiota do coco, por apresentar características probióticas relevantes. O meio à base de água de coco, adicionado ou não de suplementos, foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. O crescimento da cepa AC-1 inicialmente foi comparado ao crescimento de uma cepa comercial, o *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (LA).

QUADRO 8 – INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 E *Lactobacillus acidophilus* EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE AÇÚCAR MASCADO, EXTRATO DE LEVEDURA E LEITE DE SOJA

Cepa	Substrato	Tempo de fermentação (h)			
		4	6	8	9
AC-1	AC	0,062	0,148	0,243	0,274
	AC + AM	0,047	0,118	0,209	0,260
	AC + AM + EL	0,068	0,189	0,338	0,404
	AC + LSJ	0,046	0,107	0,200	0,241
	AC + LSJ + EL	0,061	0,175	0,304	0,381
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	AC	0,051	0,123	0,206	0,249
	AC + AM	0,037	0,100	0,183	0,226
	AC + AM + EL	0,035	0,183	0,314	0,384
	AC + LSJ	0,050	0,107	0,209	0,260
	AC + LSJ + EL	0,064	0,175	0,315	0,397

No quadro 8 são apresentados os incrementos de densidade óptica a 660 nm (IDO₆₆₀) das culturas em relação ao tempo zero, em água de coco (AC)

contendo açúcar mascavo (AM), açúcar mascavo e extrato de levedura (EL), leite de soja (LSJ) ou leite de soja e extrato de levedura. A taxa de inóculo utilizada foi de 1% (v/v) e o pH inicial ajustado para 5,5. Utilizou-se 0,5% de açúcar mascavo, 0,05% de extrato de levedura e 0,5% de leite de soja.

Observa-se que o açúcar mascavo e o leite de soja não tiveram influência positiva no crescimento das cepas testadas, mas adicionados de extrato de levedura, aumentaram significativamente o IDO₆₆₀. É provável que o extrato de levedura seja o principal responsável pelo aumento considerável no IDO₆₆₀ das cepas testadas (quadro 8).

O crescimento das cepas AC-1 e LA também foi testado utilizando AC adicionado de duas diferentes fontes de carbono: melaço de cana-de-açúcar (MCA) e mel (M). A influência da adição de extrato de levedura (EL) foi novamente testada em diferentes concentrações: 0,02% e 0,05%. No quadro 9 são apresentados os incrementos de DO₆₆₀ das cepas em relação ao tempo zero. A taxa de inóculo utilizada foi de 1% (v/v) e o pH inicial ajustado para 5,5. Utilizou-se 0,5% de MCA e 0,5% de M.

QUADRO 9 – INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 E *Lactobacillus acidophilus* EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE EXTRATO DE LEVEDURA, MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E MEL

Cepa	Substrato	Tempo de fermentação (h)	
		3	6
AC-1	AC	0,018	0,080
	AC + EL 0,05%	0,020	0,103
	AC + EL 0,02%	0,034	0,096
	AC + MCA	0,017	0,064
	AC + M	0,012	0,058
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	AC	0,008	0,057
	AC + EL 0,05%	0,018	0,086
	AC + EL 0,02%	0,023	0,105
	AC + MCA	0,022	0,059
	AC + M	0,001	0,031

Os resultados do quadro 9 mostram que novamente o EL apresentou influência positiva no crescimento das cepas testadas. No caso da cepa AC-1, a melhor porcentagem de EL foi de 0,05% e para *L. acidophilus* foi de 0,02%. As duas fontes de carbono utilizadas individualmente inibiram o crescimento das cepas em relação ao controle.

Acompanhou-se o crescimento das cepas AC-1 e *L. acidophilus* em AC com adição de EL, MCA e proteína de soja hidrolisada (PSH) como nova fonte de nitrogênio. A quantidade de proteína dosada no hidrolisado foi de 5 g/L. Foi testada ainda a adição de leite de coco (LC). O quadro 10 mostra os incrementos de DO₆₆₀ das cepas em relação ao tempo zero. A taxa de inóculo utilizada foi de 1% (v/v) e o pH inicial ajustado para 5,5. Em virtude dos resultados anteriores, a quantidade de EL utilizado foi reduzida para 0,03%. Utilizou-se 0,3% de melaço, 10 mL % de PSH e 0,05% de LC.

QUADRO 10 – INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 E *Lactobacillus acidophilus* EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE EXTRATO DE LEVEDURA, MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA E LEITE DE COCO

Cepa	Substrato	Tempo de fermentação (h)			
		4	6	8	23
AC-1	AC	0,025	0,039	0,084	0,085
	AC + EL + MCA + PSH	0,033	0,072	0,199	0,401
	AC + EL + MCA + PSH + LC	0,038	0,103	0,213	0,409
<i>L. acidophilus</i>	AC	0,027	0,047	0,095	0,111
ATCC 4356	AC + EL + MCA + PSH	0,060	0,112	0,226	0,406
	AC + EL + MCA + PSH + LC	0,073	0,117	0,203	0,384

Observa-se no quadro 10 que a combinação de EL, MCA e PSH aumentou significativamente o incremento de DO₆₆₀ para as duas cepas estudadas. No caso da cepa AC-1, a adição de leite de coco aumentou um pouco o incremento da densidade óptica, mas não é uma diferença significativa em relação ao meio sem leite de coco. Para o *L. acidophilus*, adição de leite de coco teve influência negativa no incremento

de densidade óptica, em relação ao meio sem o produto. Portanto, a adição de leite de coco ao meio não influenciou o crescimento das cepas estudadas.

Nos três testes realizados anteriormente, os incrementos de DO_{660} para as duas cepas estudadas seguiram a mesma tendência. Sendo assim, os testes seguintes foram realizados utilizando apenas a cepa AC-1, a qual foi utilizada no preparo da bebida fermentada à base de água de coco.

No quadro 11 são apresentados os IDO_{660} da cepa AC-1 em relação ao tempo zero, em AC adicionada de EL ou MCA ou PSH ou ainda os três suplementos em diferentes combinações. A taxa de inóculo utilizada foi aumentada para 2% (v/v) e o pH inicial ajustado para 5,5. Utilizou-se 0,03% de EL, 10 mL % de PSH e 0,3% de MCA.

QUADRO 11 – INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM ÁGUA DE COCO ADICIONADA DE EXTRATO DE LEVEDURA, MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA

Substrato	Tempo de fermentação (h)			
	4	6	8	24
AC	0,028	0,065	0,103	0,143
AC + EL	0,068	0,119	0,220	0,367
AC + EL + M	0,063	0,111	0,209	0,331
AC + PSH	0,065	0,155	0,213	0,310
AC + PSH + M	0,084	0,153	0,229	0,320
AC + EL + PSH	0,083	0,170	0,266	0,338
AC + EL + PSH + M	0,085	0,165	0,251	0,349

Observa-se no quadro 11 que o maior IDO_{660} ocorreu em 24 horas de fermentação adicionando-se à água de coco apenas extrato de levedura. Na produção de bebidas fermentadas, um dos principais requisitos é atingir alta concentração de células viáveis no menor tempo possível. Em 8 horas de fermentação, o uso de EL em conjunto com PSH forneceu o maior IDO_{660} . Assim, optou-se por utilizar água de coco adicionada de EL e PSH. Em combinação com o EL, a adição de MCA ao meio não teve influência positiva no incremento da DO_{660} em nenhum dos tempos testados, quando comparado ao uso somente de EL. Mas em combinação com PSH, o uso de

MCA aumentou um pouco o incremento da DO_{660} em 4, 8 e 24 horas de fermentação em relação ao uso somente de PSH. Quando adicionado à mistura de EL e PSH, o uso de MCA aumentou o IDO_{660} em 4 e em 24 horas de fermentação.

Foi testada também a adição de sacarose ao meio de cultivo em diferentes concentrações com a finalidade de aumentar a produção de biomassa celular e melhorar o sabor da bebida à base de água de coco. Os resultados são apresentados no quadro 12. A taxa de inóculo utilizada foi de 3% (v/v) e o pH inicial ajustado para 5,5. Utilizou-se 0,03% de EL e 10 mL % de PSH. O aumento na porcentagem de sacarose foi inversamente proporcional ao aumento no IDO_{660} de AC-1. Porém, baixas concentrações de sacarose, em torno de 1%, influenciam positivamente no crescimento da cepa em meio à base de água de coco com 0,03% de EL e 10 mL % de PSH, em relação ao controle.

QUADRO 12 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SACAROSE NO INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1

Sacarose (%)	Tempo de fermentação (h)	
	4	8
0	0,074	0,261
1	0,079	0,272
3	0,075	0,265
5	0,074	0,236
7	0,058	0,198
10	0,055	0,172

4.4.2 Otimização do pH Inicial e da Taxa de Inoculação

Na seqüência, foram realizadas otimizações do pH inicial e da taxa de inoculação partindo-se de um meio à base de água de coco adicionado de 0,03% de EL e 10 mL % de PSH, pois esta composição forneceu os melhores resultados de IDO_{660} em 8 horas de fermentação. Otimizou-se primeiramente o pH inicial partindo-se de uma taxa de inóculo de 2% (v/v). Os resultados são apresentados no quadro 13.

QUADRO 13 – INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO COM DIFERENTES NÍVEIS DE pH

pH	Tempo de fermentação (h)		
	4	6	8
4,0	0,093	0,196	0,326
4,5	0,102	0,212	0,336
5,0	0,105	0,211	0,328
5,5	0,105	0,192	0,301

De acordo com o quadro 13, o maior IDO₆₆₀ foi atingido em 8 horas de fermentação utilizando-se um pH inicial de 4,5. Assim, os testes para otimização da taxa de inoculação foram realizados utilizando pH inicial de 4,5 em AC adicionada de 0,03% de EL e 10 mL % de PSH. Os valores obtidos constam no quadro 14.

QUADRO 14 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PORCENTAGENS DE INOCULAÇÃO NO INCREMENTO DA DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO

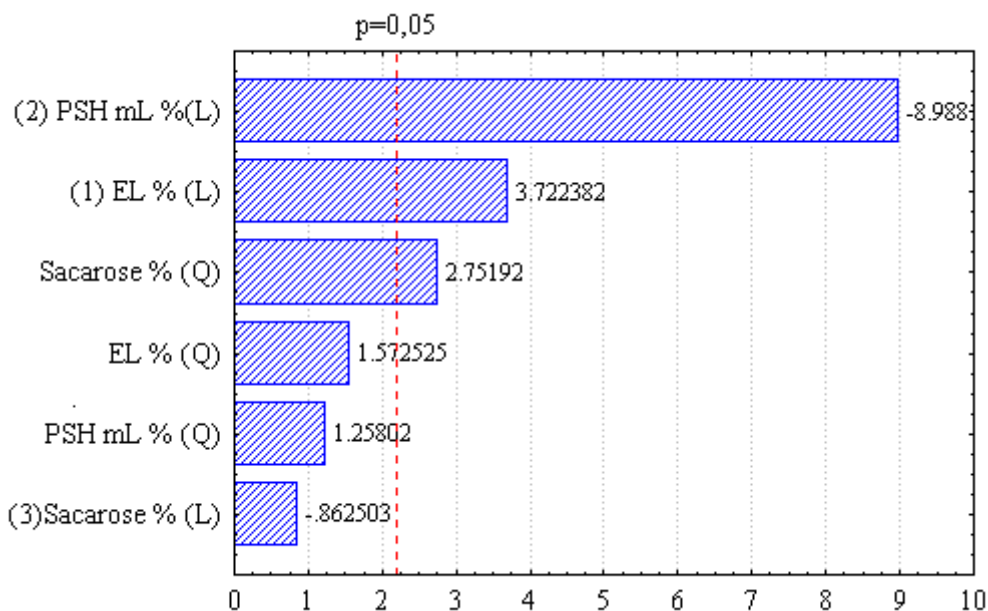
Taxa de inoculação (%)	Tempo de fermentação (h)			
	3	5	7	9
2	0,054	0,132	0,234	0,304
3	0,074	0,166	0,277	0,330
4	0,086	0,184	0,280	0,312

Observa-se no quadro 14 que o maior IDO₆₆₀ foi atingido utilizando uma taxa de 3% (v/v) de inóculo. Nos testes realizados na sequência, o pH inicial do meio à base de água de coco foi ajustado para 4,5 e utilizou-se uma taxa de inoculação de 3% (v/v).

4.4.3 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Pura

Com o objetivo de definir as quantidades ótimas de extrato de levedura (EL), proteína de soja hidrolisada (PSH) e sacarose para a cepa AC-1, foi realizado um planejamento experimental 3^{3-1} conforme descrito no item 3.6.3. Os resultados do teste são apresentados nas figuras 52 a 54, com 95% de significância ($p < 0,05$).

FIGURA 52 – GRÁFICO DE PARETO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA, EXTRATO DE LEVEDURA E SACAROSE NO CRESCIMENTO DE AC-1



Os resultados apresentados no diagrama de Pareto (figura 54) sugerem que os três suplementos utilizados no experimento foram significativos para o crescimento da cepa AC-1 em água de coco, com $p < 0,05$. O valor obtido para R^2 foi de 0,91 e o modelo estatístico utilizado é representado pela seguinte equação 8.

$$IDO_{660} = 0,26 + 0,78xEL - 5,56xEL^2 - 0,00042xPSH - 0,00007xPSH^2 + 0,025xS - 0,00875xS^2 \quad (8)$$

onde IDO_{660} é o incremento de densidade óptica a 660 nm, EL é a porcentagem de extrato de levedura, PSH é a concentração de proteína de soja hidrolisada em mL % e S é a porcentagem de sacarose adicionada à água de coco.

Pela equação 8, os maiores valores de densidade óptica são obtidos em água de coco suplementada com 0,07% de extrato de levedura, 1,4% de sacarose e proteína de soja hidrolisada em quantidades inferiores a 2 mL %, o que é confirmado pelos gráficos de contorno mostrados nas figuras 53 e 54.

FIGURA 53 – GRÁFICO DE CONTORNO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA E DO EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DE AC-1

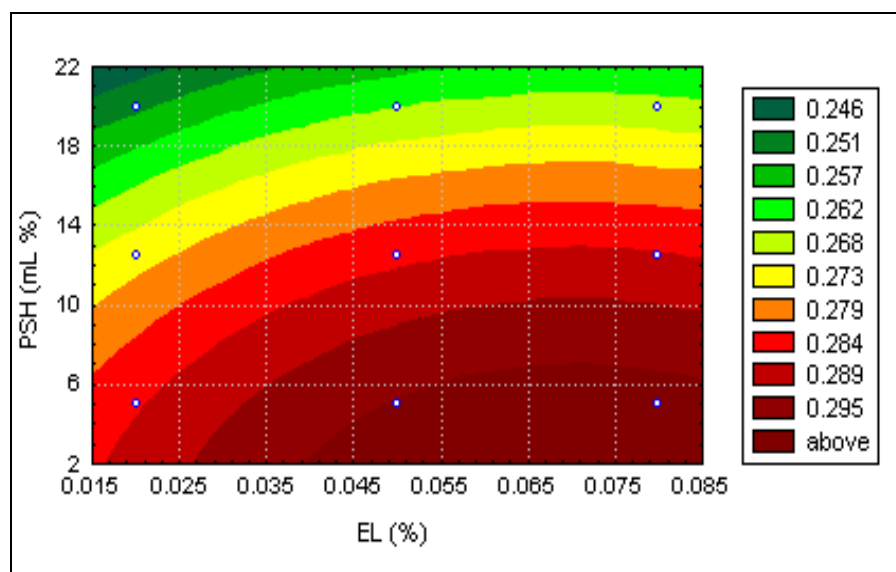
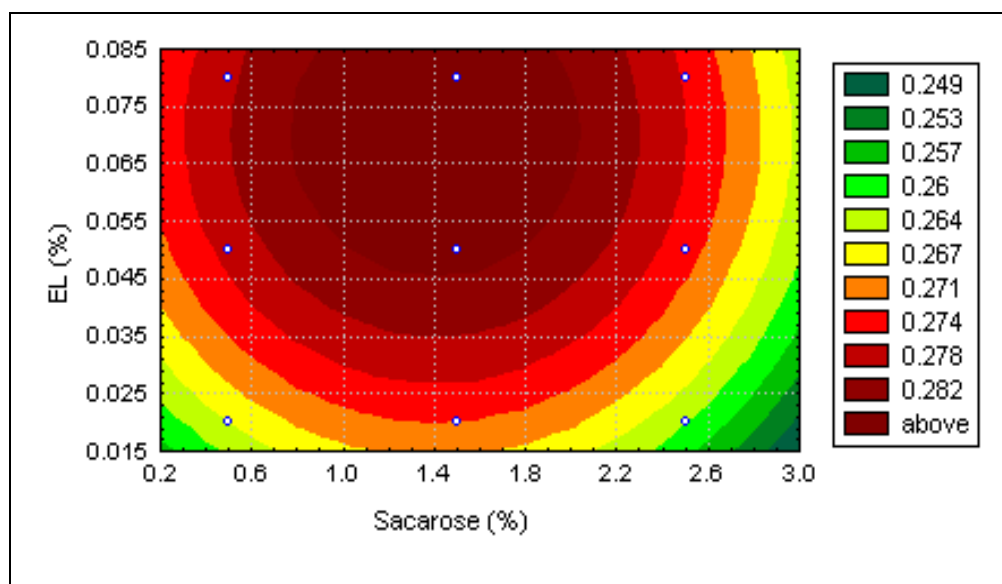


FIGURA 54 – GRÁFICO DE CONTORNO COM A INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE LEVEDURA E DA SACAROSE NO CRESCIMENTO DE AC-1



Apesar da quantidade ótima de extrato de levedura ter sido de 0,07%, optou-se por se utilizar uma quantidade menor para evitar a presença de sabor residual desse

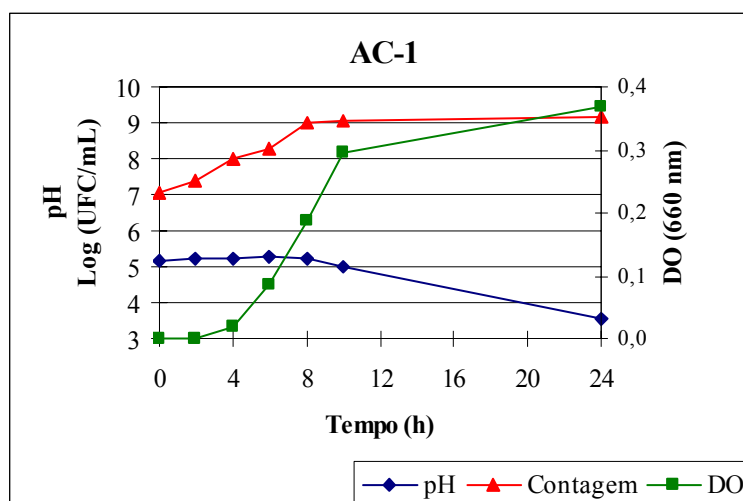
componente na bebida final. Trabalhou-se com 0,05% de extrato de levedura que foi a quantidade máxima do componente que não proporcionou sabor residual e situou-se na faixa ótima de crescimento da cultura AC-1 que foi entre 0,05 e 0,08%, conforme as figuras 53 e 54.

Outro aspecto importante está relacionado ao pH inicial do meio à base de água de coco. Embora tenha se otimizado o pH do meio em 4,5, existe a necessidade de se trabalhar com um pH mais elevado para evitar excessiva acidificação da bebida, o que seria um atributo indesejável à mesma. Quando se trabalha com um pH inicial muito baixo, obtém-se ao final da fermentação um caldo com excessiva acidez, dificultando a manutenção da viabilidade da cultura durante o período de estocagem. Deve-se levar em consideração que, mesmo sob refrigeração, a cultura reduz, mas não cessa completamente sua atividade e o pH continua diminuindo.

4.4.4 Estudo Cinético com Cultura Pura

Um estudo cinético utilizando a cultura AC-1 foi realizado conforme descrito no item 3.6.4. Os resultados são apresentados na figura 55.

FIGURA 55 – VARIAÇÃO DO pH, VIABILIDADE CELULAR E DENSIDADE ÓPTICA DE AC-1 EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO

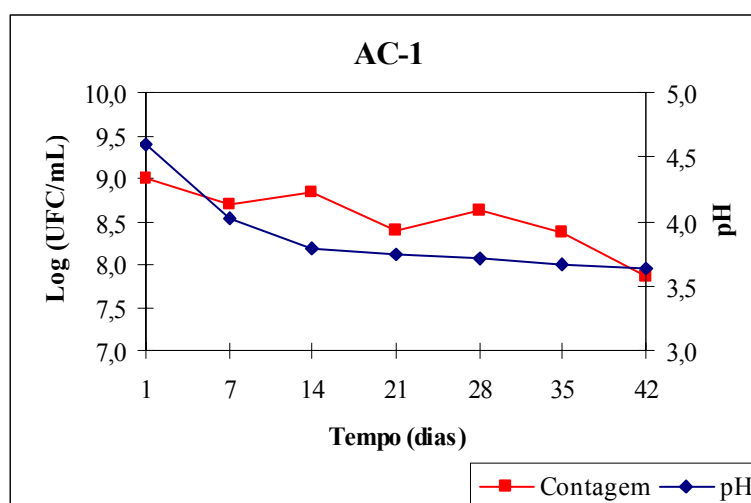


Observa-se que o pH se manteve praticamente estável em 5,2 durante as primeiras 8 horas de fermentação, e a partir daí caiu até as 24 horas do estudo, atingindo o valor de 3,6. A densidade óptica começou a aumentar a partir de 4 horas de fermentação (0,020), crescendo consideravelmente até 10 horas de incubação (0,294) e bem mais lentamente até as 24 horas em que o estudo foi realizado. A concentração celular de AC-1 aumentou 2 ciclos logarítmicos em 8 horas de incubação a 37 °C, tempo em que a cultura atingiu a fase estacionária. Neste intervalo de tempo, o número de células viáveis variou de $1,2 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ UFC/mL. A maior contagem celular foi atingida nas 24 horas do estudo, chegando a $1,4 \times 10^9$ UFC/mL.

4.4.5 Estabilidade da Bebida Fermentada com Cultura Pura

O pH e a contagem celular da bebida fermentada com a cultura AC-1 e preparada conforme o item 3.6.5 foram avaliados durante 42 dias de armazenamento sob refrigeração. Os resultados são mostrados na figura 56. Observa-se que o pH caiu consideravelmente de 4,6 a 3,8 nos primeiros 14 dias de estocagem e se manteve constante, em torno de 3,7, até o final do experimento. A contagem celular da bebida iniciou com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL e oscilou até 28 dias de armazenamento. A partir daí começou a diminuir até 42 dias, atingindo contagem de $7,4 \times 10^7$ UFC/mL.

FIGURA 56 – VARIAÇÃO DO pH E DA CONTAGEM DE AC-1 DURANTE O ARMAZENAMENTO DO FERMENTADO SOB REFRIGERAÇÃO



Segundo FAO/WHO (2001), para apresentar efeito probiótico os microrganismos devem estar presentes em grande quantidade, geralmente acima de um bilhão por dose diária ingerida. Isto significa que, mesmo após 42 dias de armazenamento, a ingestão de menos de 15 mL da bebida por dia supriria esta condição.

4.4.6 Tratamento Térmico da Água de Coco

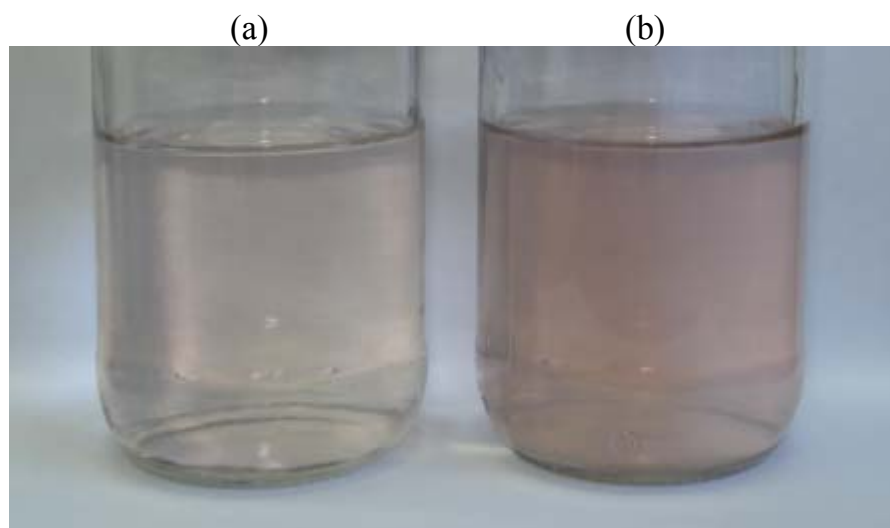
O tratamento térmico utilizado até esta etapa de desenvolvimento da bebida fermentada à base de água de coco foi a esterilização a 121 °C durante 15 minutos. Esta temperatura elevada torna o caldo muito escuro devido ao processo de caramelização dos açúcares presentes no meio. Foram testadas diferentes combinações de tempo e temperatura para o tratamento térmico da água de coco, com o objetivo de eliminar a flora natural do meio e evitar o escurecimento excessivo. Os resultados são apresentados na tabela 20.

TABELA 20 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS DA ÁGUA DE COCO

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Mesófilos (UFC/mL)	Aspecto Visual
-	-	$4,7 \times 10^4$	Límpido e incolor
62	30	$7,1 \times 10^2$	Límpido e incolor
75	30	35	Límpido e róseo
75	45	10	Límpido e róseo
75	60	Ausência	Límpido e róseo
75	75	Ausência	Límpido e róseo
75	90	Ausência	Límpido e róseo
80	25	Ausência	Límpido e róseo
85	20	Ausência	Límpido e róseo
90	10	Ausência	Límpido e róseo
100	5	Ausência	Límpido e róseo
100	10	Ausência	Límpido e róseo
100	15	Ausência	Límpido e róseo
121	15	Ausência	Límpido e caramelo

Devido à presença das enzimas polifenoloxidase e peroxidase na água de coco, a partir de 75° C já se observou o desenvolvimento da cor rósea, após o resfriamento do meio. Um choque térmico em água corrente, imediatamente após o tratamento térmico, reduziu quase completamente o desenvolvimento dessa coloração, conforme figura 57. Observa-se na figura 57a que a coloração do meio após tratamento térmico seguido de choque térmico é consideravelmente mais clara que o meio que não passou pelo choque térmico (figura 57b).

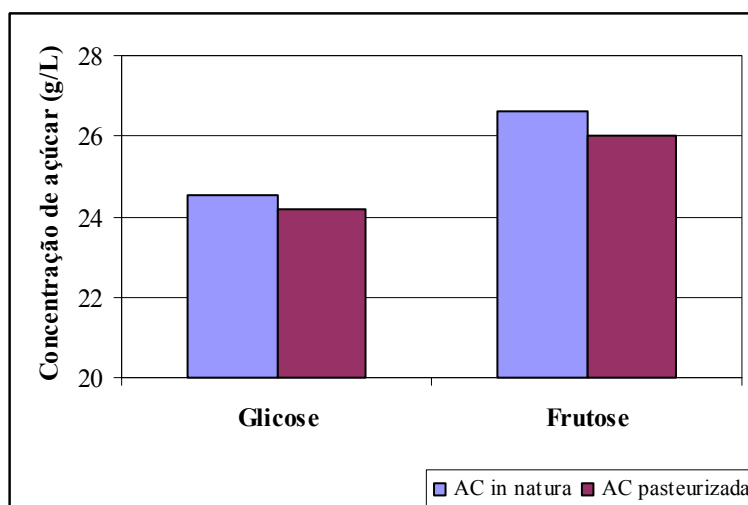
FIGURA 57 – COLORAÇÃO DA ÁGUA DE COCO APÓS TRATAMENTO TÉRMICO COM E SEM CHOQUE TÉRMICO



Para eliminar a grande maioria dos microrganismos e garantir a segurança dos consumidores, foi escolhido o tratamento térmico a 100 °C durante 15 minutos, seguido de um choque térmico do meio à base de água de coco, até que este atingisse a temperatura ambiente. As fermentações foram realizadas logo após este procedimento.

Após o processo de tratamento térmico, a água de coco foi analisada em CLAE, conforme descrito no item 3.4.4, e comparada com a mesma amostra *in natura*. O teste foi realizado em duplicata e as médias dos resultados constam na figura 58. Observa-se que a redução nas quantidades de glicose e frutose após a pasteurização foi de apenas 1,6% e 2,3%, respectivamente, o que não influencia no desenvolvimento das culturas durante a fermentação.

FIGURA 58 – CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE NA ÁGUA DE COCO ANTES E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO

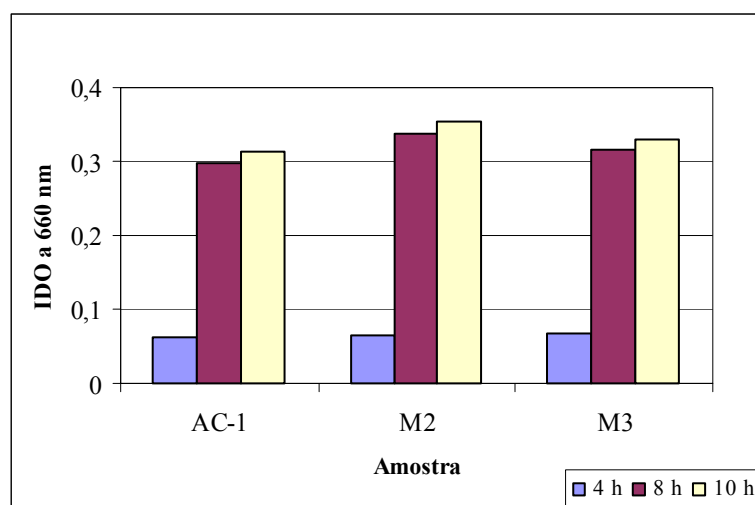


4.4.7 Testes com Culturas Mistas

Na segunda etapa do desenvolvimento da bebida fermentada à base de água de coco foi realizado um estudo cinético utilizando apenas a cepa AC-1, uma mistura 1:1 de AC-1 e BFL-9 (M2) ou ainda uma mistura 1:1:1 das culturas AC-1, B-7 e BFL-9 (M3). O teste foi realizado conforme descrito no item 3.6.6 e os resultados são apresentados nas figuras 59 a 64.

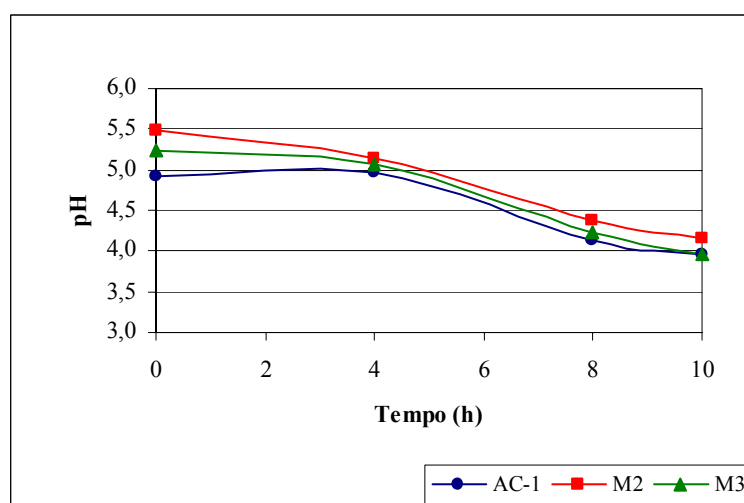
Observa-se na figura 59 que o incremento de densidade óptica foi maior utilizando culturas mistas em relação ao uso de cultura individual. Os maiores valores foram obtidos com a mistura M2 (AC-1 e BFL-9), seguida de M3 e com menor crescimento, AC-1. Nos três casos, os incrementos de DO em 8 e 10 horas de fermentação foram bastante semelhantes, o que indica que a partir de 8 horas de fermentação as culturas começam a entrar na fase estacionária.

FIGURA 59 – COMPARAÇÃO DO INCREMENTO DE DENSIDADE ÓPTICA DA CULTURA PURA E DA CULTURAS MISTAS



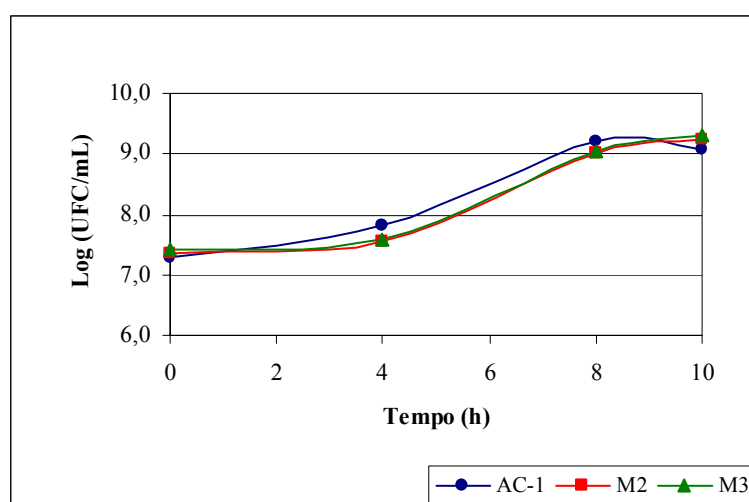
A figura 60 mostra que a variação de pH das três amostras seguiu a mesma tendência. Até 8 horas de incubação a queda de pH foi mais acentuada e a partir deste ponto, houve redução mais suave nos valores do pH, o que confirma a hipótese da fase estacionária iniciar em 8 horas de incubação. Os menores valores de pH foram atingidos pelas amostras AC-1 e M3, enquanto a mistura M2 manteve um pH superior às demais amostras devido à maior porcentagem de *Bifidobacterium* no inóculo.

FIGURA 60 – COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS



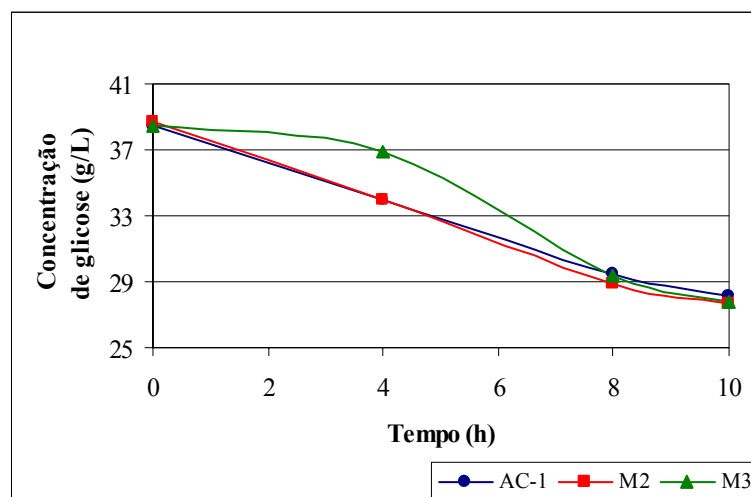
Na figura 61 verifica-se que para a cepa AC-1, o aumento do número de células viáveis foi verificado até 8 horas de incubação, seguido de uma pequena redução neste número em 10 horas. No caso das amostras M2 e M3, o aumento da concentração celular seguiu a mesma tendência, havendo um pequeno aumento da contagem entre 8 e 10 horas de fermentação. Este fato se deve à presença da cepa BFL-9 nestas duas amostras, cujo crescimento é mais lento em relação aos *Lactobacillus*.

FIGURA 61 – COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS



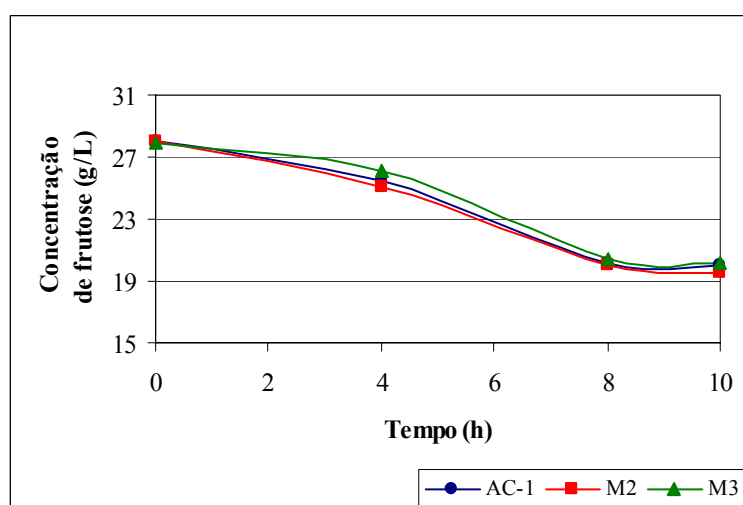
As figuras 62 e 63 apresentam o consumo de açúcares durante a fermentação. Observa-se que o consumo de glicose seguiu a mesma tendência para a cultura AC-1 e para a mistura M2 durante todo o teste. Embora a mistura M3 tenha metabolizado a glicose mais lentamente, a partir de 8 horas de fermentação o consumo deste açúcar foi praticamente igual para todas as culturas. A queda na concentração de glicose foi mais acentuada até 8 horas de incubação e, a partir desse ponto, essa redução foi mais amena. O consumo de glicose nas 10 horas de fermentação foi de cerca de 28%.

FIGURA 62 – COMPARAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE GLICOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS



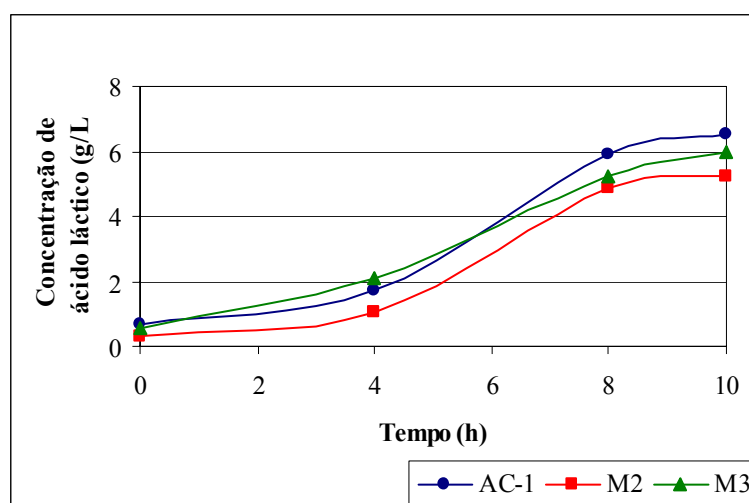
Na figura 63, verifica-se que o consumo de frutose seguiu a mesma tendência para todas as culturas estudadas, mas observa-se novamente uma pequena diferença da mistura M3 em relação às demais. A redução na concentração de frutose foi acentuada até 8 horas de incubação e manteve-se praticamente estável até o final do teste. A quantidade de frutose consumida foi de aproximadamente 29% nas 10 horas de fermentação.

FIGURA 63 – COMPARAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE FRUTOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS



Na figura 64, nota-se que a maior produção de ácido láctico ocorreu com a cultura AC-1 (5,9 g/L), seguida da mistura M3 (5,4 g/L) e M2 (4,9 g/L). As pequenas quantidades de ácido láctico observadas no início da fermentação são provenientes do inóculo. Para as culturas AC-1 e M2, o pico de produção de ácido láctico ocorreu entre 4 e 8 horas de fermentação. O mesmo não ocorreu para a mistura M3, já que a concentração do ácido continuou aumentando entre 8 e 10 horas de fermentação.

FIGURA 64 – COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS

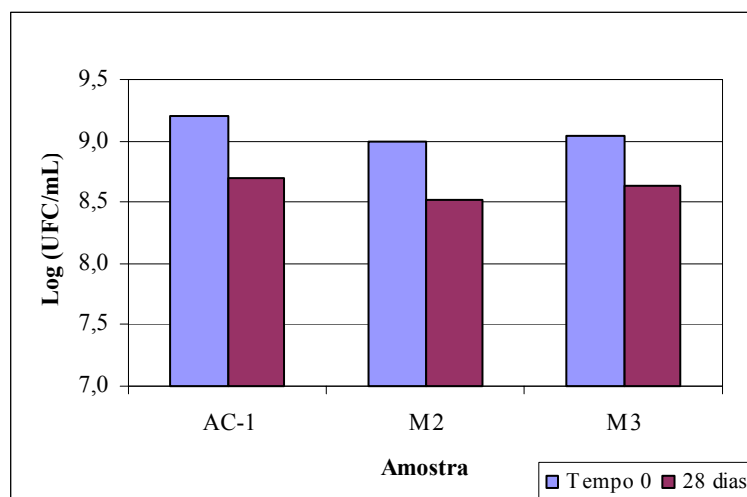


Como os dados apresentados nas figuras 59 a 64 mostram que a fase estacionária foi atingida em 8 horas de fermentação, estas amostras foram mantidas sob refrigeração a 5° C durante 4 semanas para posterior análise de pH, contagem celular e concentrações de glicose, frutose e ácido láctico. Os resultados são apresentados nas figuras 65 a 69.

Em relação ao tempo inicial, a porcentagem de morte celular durante o tempo de armazenamento foi muito próxima para as três amostras estudadas: 5,49 %, 5,35 % e 4,51% para AC-1, M2 e M3, respectivamente (figura 65). Os resultados mostram que nos três casos a perda de viabilidade foi baixa durante o período de armazenamento, ficando as contagens em torno de 4×10^8 UFC/mL. A menor porcentagem de morte celular ocorreu para a mistura M3. Este fato pode ser explicado pela presença da cepa

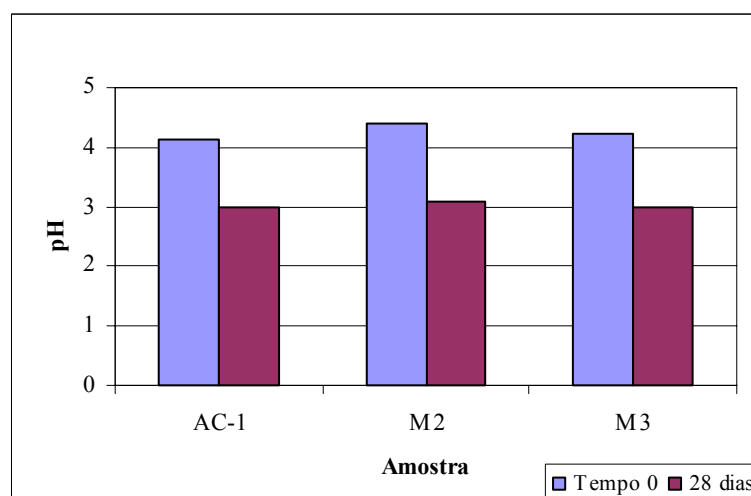
B-7. Provavelmente o exopolissacarídeo produzido por esta cultura apresenta efeito protetor sobre as células presentes na bebida.

FIGURA 65 – VARIAÇÃO DA CONTAGEM CELULAR DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO



Embora o pH inicial tenha sido diferente para as três amostras estudadas, não houve diferença significativa no pH final das mesmas, ficando todos próximos de 3,0 (figura 66).

FIGURA 66 – VARIAÇÃO DO pH DA CULTURA PURA E DAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO



As figuras 67, 68 e 69 mostram, respectivamente, a variação nas concentrações de glicose, frutose e ácido láctico durante o período de armazenamento a 5 °C. Durante os 28 dias de armazenamento, a quantidade de glicose caiu em média 9%, a concentração de frutose diminuiu cerca de 13% e a de ácido láctico aumentou em média 29%.

FIGURA 67 – CONSUMO DE GLICOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO

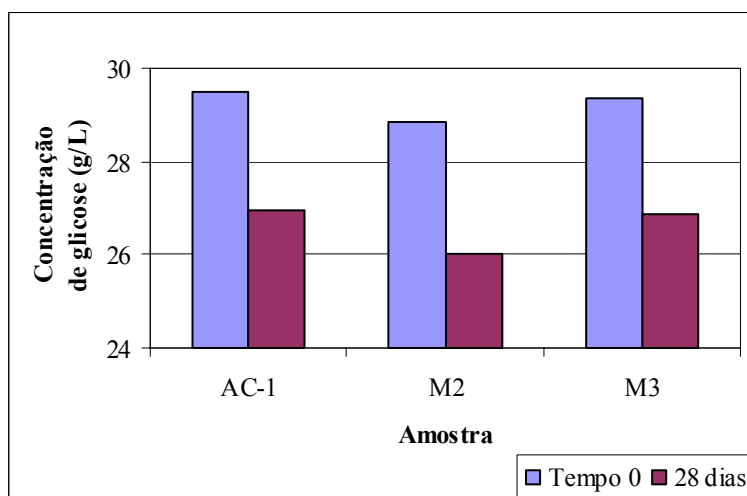
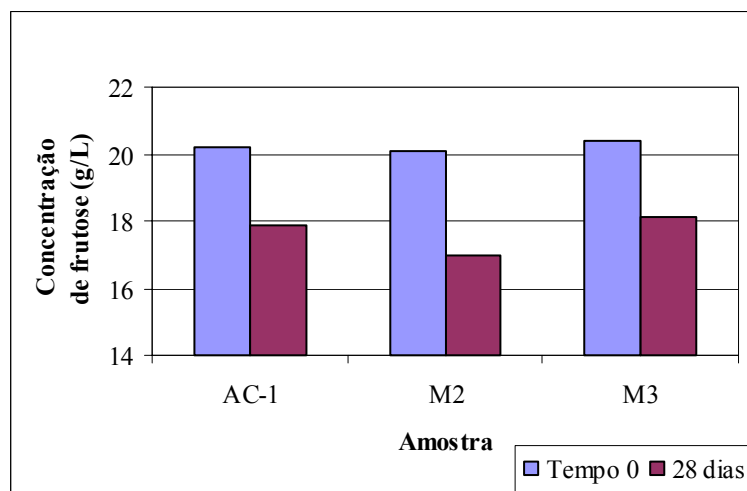


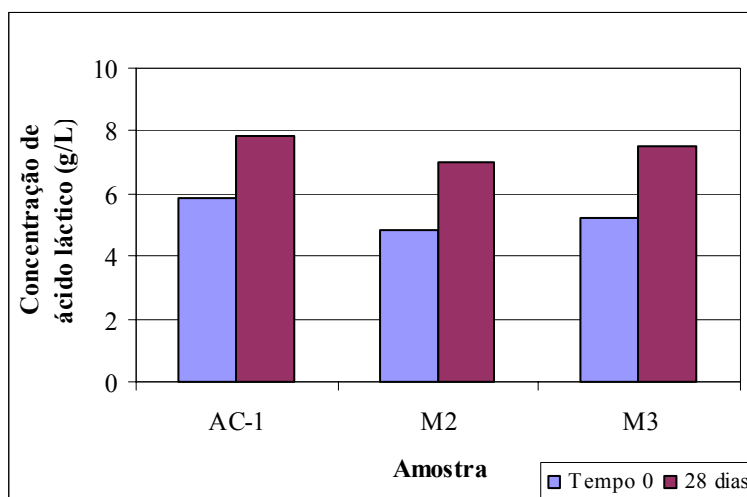
FIGURA 68 – CONSUMO DE FRUTOSE PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO



Observa-se na figura 67 que o menor decréscimo na concentração de glicose, em relação ao tempo zero, ocorreu com a mistura M3 (8,5%). No caso da frutose (figura 68), a mistura M3 também foi responsável pela menor redução no consumo do açúcar durante o armazenamento (11,1%).

A figura 69 mostra que o aumento na concentração de ácido láctico, durante o período de armazenamento sob refrigeração, foi considerável. Em relação ao tempo zero, o maior incremento na concentração de ácido láctico foi de 30,7% para a mistura M3.

FIGURA 69 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELA CULTURA PURA E PELAS CULTURAS MISTAS APÓS 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO



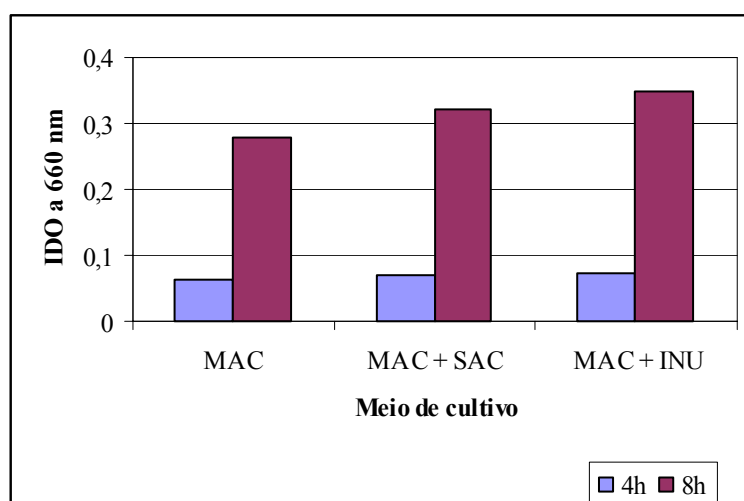
Nas figuras 66 a 69 observa-se que as culturas não cessam completamente sua atividade, mesmo quando mantidas sob refrigeração.

A presença de uma cultura de *Bifidobacterium* (BFL-9) e de uma cultura produtora de exopolissacarídeo, a qual pode apresentar efeito antitumoral (B-7), juntamente com a cultura AC-1 só tende a aumentar o efeito probiótico da bebida fermentada. Assim, a mistura M3 foi escolhida para produção da bebida fermentada à base de água de coco porque também apresentou menor redução na contagem de células viáveis e foi responsável pelo menor consumo de glicose e frutose e pela maior produção de ácido láctico durante o período de 28 dias em que a bebida foi mantida sob refrigeração.

4.4.8 Teste de Crescimento com Prebiótico e Cultura Mista

Foi avaliada também a adição de um prebiótico ao meio à base de água de coco e sua influência no incremento da densidade óptica utilizando a mistura 1:1:1 de AC-1, B-7 e BFL-9. O crescimento da cultura mista foi realizado em meio sem adição de açúcar, com adição de sacarose e com adição do prebiótico, conforme descrito no item 3.6.9. Os resultados aparecem na figura 70.

FIGURA 70 – CRESCIMENTO DA CULTURA MISTA EM MEIO SEM ADIÇÃO DE AÇÚCAR, COM ADIÇÃO DE SACAROSE E COM ADIÇÃO DE INULINA

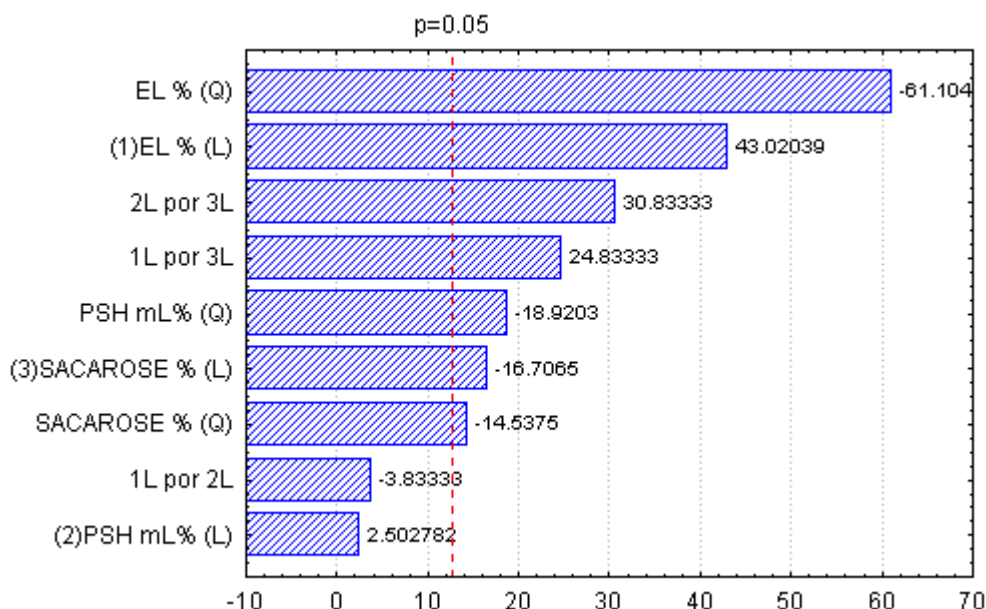


Verifica-se que o IDO_{660} em 4 horas de incubação foi muito próximo nos três meios utilizados. Mas em 8 horas de incubação já se observa maior IDO_{660} nos meio com sacarose e com inulina em relação ao controle (MAC). Embora no meio com adição de inulina o incremento de DO_{660} tenha sido superior ao do meio com sacarose, escolheu-se utilizar a sacarose na produção da bebida fermentada devido principalmente à maior disponibilidade e menor custo. Um quilograma de açúcar comum custa em média R\$1,50, enquanto um quilograma de inulina custa quase dez vezes mais, em torno de R\$12,00.

4.4.9 Otimização da Composição do Meio de Fermentação para Cultura Mista

Definidas as culturas a serem utilizadas na produção da bebida fermentada à base de água de coco, foi realizada uma nova otimização das quantidades de extrato de levedura (EL), proteína de soja hidrolisada (PSH) e sacarose para a mistura 1:1:1 de AC-1, B-7 e BFL-9. O planejamento experimental foi composto central rotacional com 3 fatores em 5 níveis, conforme o item 3.6.10. Os resultados do teste são apresentados nas figuras 71 a 73, com 95% de significância ($p < 0,05$).

FIGURA 71 – DIAGRAMA DE PARETO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA, EXTRATO DE LEVEDURA E SACAROSE NO CRESCIMENTO DA MISTURA 1:1:1 DE AC-1, B-7 E BFL-9



Os resultados apresentados na figura 71 sugerem que os três suplementos utilizados foram significativos para o crescimento da mistura das culturas AC-1, B-7 e BFL-9 em água de coco, com $p < 0,05$. O valor obtido para R^2 foi de 0,91 e o modelo estatístico utilizado é representado pela equação 9.

$$\begin{aligned} \text{IDO}_{660} = & 0,1887 + 2,3685 \times \text{EL} - 11,9840 \times \text{EL}^2 + 0,0065 \times \text{PSH} - 0,0041 \times \text{PSH}^2 - 0,0381 \times \text{S} \\ & - 0,0071 \times \text{S}^2 - 0,0268 \times \text{EL} \times \text{PSH} + 0,2609 \times \text{EL} \times \text{S} + 0,0109 \times \text{PSH} \times \text{S} \end{aligned} \quad (9)$$

onde IDO_{660} é o incremento de densidade óptica a 660 nm, EL é a porcentagem de extrato de levedura, PSH é a concentração de proteína de soja hidrolisada em mL % e S é a porcentagem de sacarose adicionada à água de coco.

FIGURA 72 – GRÁFICO DE CONTORNO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA E EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DA MISTURA 1:1:1 DE AC-1, B-7 E BFL-9

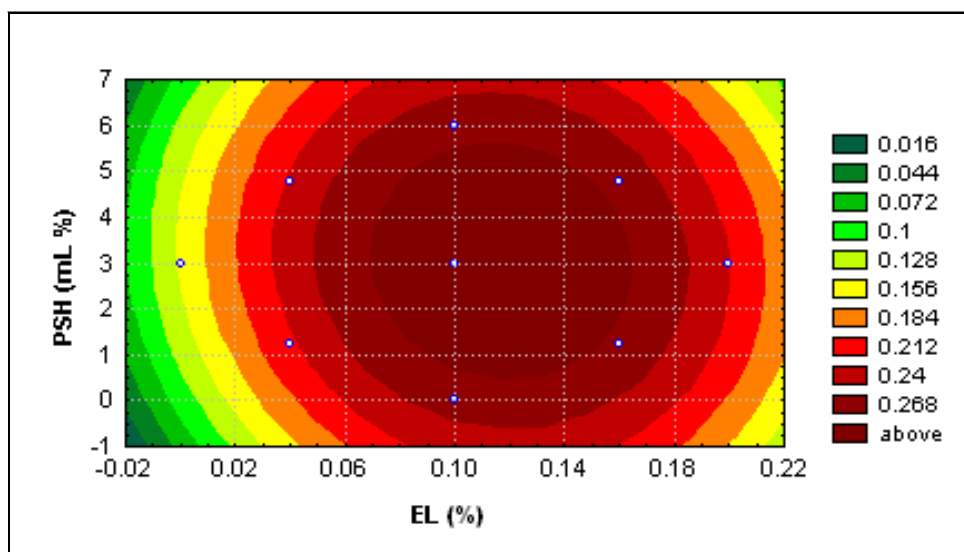
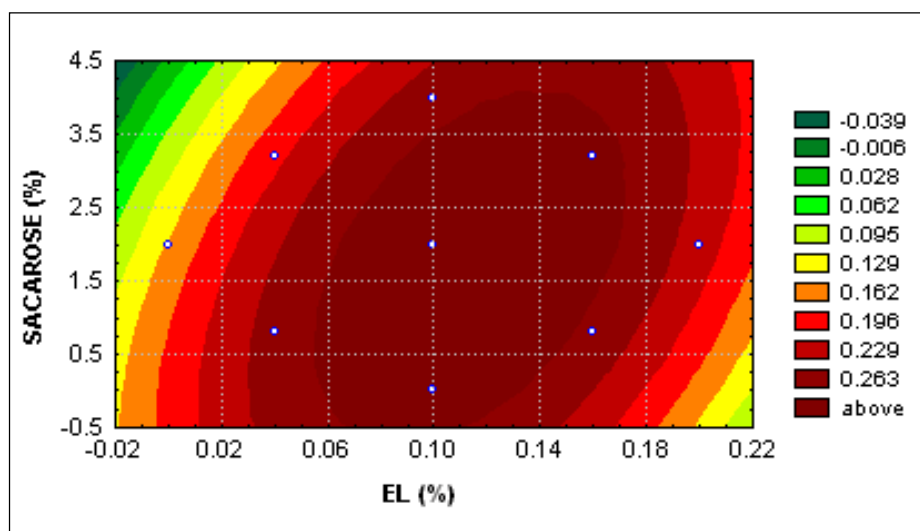


FIGURA 73 – GRÁFICO DE CONTORNO COM A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SACAROSE E EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DA MISTURA 1:1:1 DE AC-1, B-7 E BFL-9



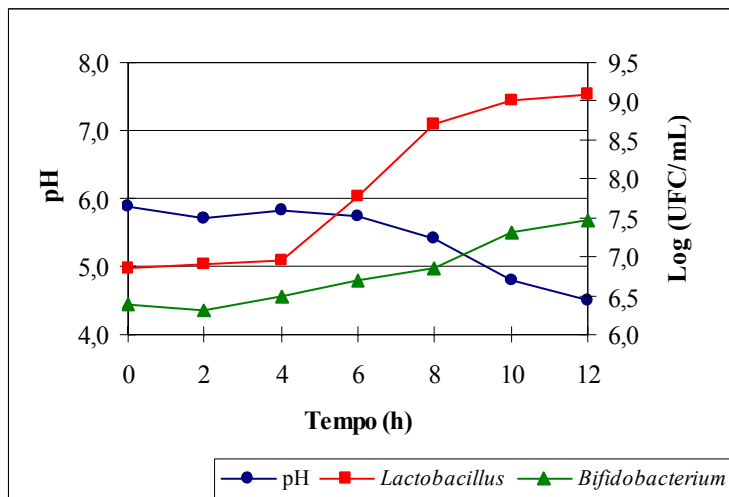
Pela equação 9, os maiores valores de densidade óptica para a mistura 1:1:1 de AC-1, B-7 e BFL-9 são obtidos em água de coco suplementada com 0,12% de extrato de levedura, 2,3% de sacarose e 3,5 mL % de proteína de soja hidrolisada, o que é confirmado pelos gráficos de contorno (figuras 72 e 73).

Embora a quantidade ótima de extrato de levedura tenha sido de 0,12%, novamente optou-se por utilizar uma quantidade de 0,05% para evitar o sabor residual desse componente na bebida final.

4.4.10 Estudo Cinético Utilizando Cultura Mista

Foi realizado também um estudo cinético utilizando a mistura 1:1:1 de AC-1, B-7 e BFL-9, conforme descrito no item 3.6.8. Os resultados são mostrados nas figuras 74 e 75.

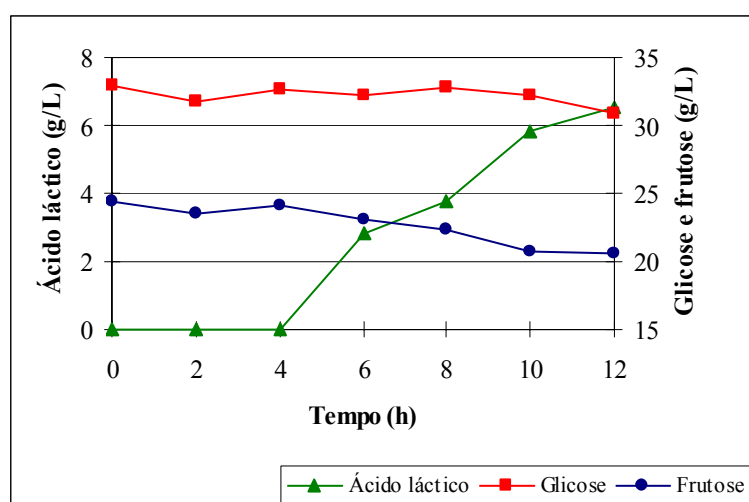
FIGURA 74 – VARIAÇÃO DO pH E DA CONTAGEM DE *Lactobacillus* E *Bifidobacterium* PARA CULTURA MISTA EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO



Observa-se na figura 74 que o pH se manteve estável em torno de 5,8 durante as primeiras 6 horas de fermentação. A partir daí diminuiu consideravelmente até 10 horas e mais lentamente até 12 horas de fermentação. A maior queda de pH ocorreu entre 6 e 10 horas de fermentação, passando de 5,7 para 4,8. Durante o estudo, a concentração celular de *Lactobacillus* aumentou mais de 2 ciclos logarítmicos,

enquanto que a concentração de *Bifidobacterium* aumentou apenas 1 ciclo logarítmico, confirmando o fato de que este gênero cresce mais lentamente em relação ao *Lactobacillus*. Em 12 horas de fermentação a 37 °C, o número de células viáveis de *Bifidobacterium* variou de $2,5 \times 10^6$ para $3,0 \times 10^7$ UFC/mL, enquanto para os *Lactobacillus* essa variação foi bem superior, de $7,0 \times 10^6$ para $1,2 \times 10^9$ UFC/mL. A maior taxa de crescimento do *Lactobacillus* ocorreu entre 4 e 8 horas de fermentação, enquanto que para o *Bifidobacterium* foi entre 8 e 10 horas.

FIGURA 75 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO, GLICOSE E FRUTOSE PARA CULTURA MISTA EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO



Neste estudo realizado com cultura mista, observa-se que o ácido láctico começou a se formar a partir de 4 horas de fermentação. A concentração máxima atingida foi de 6,5 g/L em 12 horas de incubação (figura 75). A maior produção de ácido láctico ocorreu entre 4 e 6 horas de fermentação. Observa-se ainda que o consumo de açúcares foi baixo e, conseqüentemente, a quantidade de açúcares residuais manteve-se alta ao final do experimento. A concentração de açúcares totais passou de 48 para 43,4 g/L, a de glicose passou de 33 para 31 g/L e de frutose de 24,5 para 20,5 g/L. As culturas utilizadas deram preferência pelo consumo de frutose à glicose, reduzindo-a em apenas 6%, enquanto que a quantidade de frutose diminuiu em 15,5%. A concentração de frutose manteve-se praticamente estável até 4 horas de

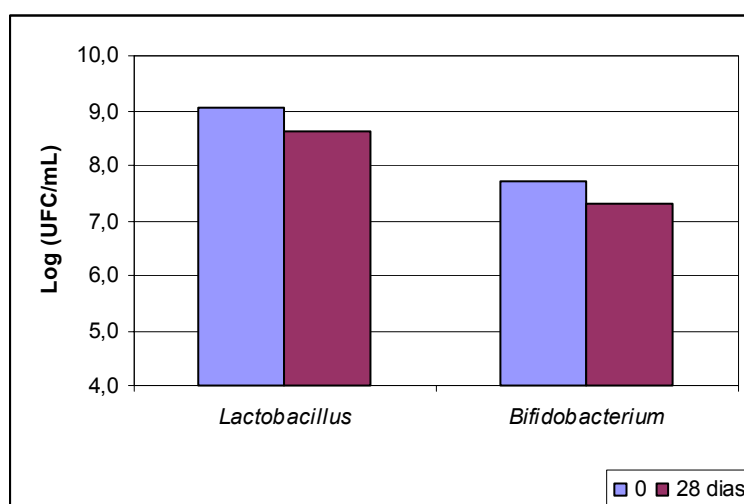
fermentação, foi consumida até 10 horas e se manteve novamente estável até o final do experimento.

Com base nos resultados apresentados, o tempo ótimo de fermentação do meio à base de água de coco para cultura mista de AC-1, B-7 e BFL-9 foi de 10 horas. A contagem de *Bifidobacterium* ainda não havia atingido um número expressivo até esse momento de incubação, mas devido ao fato de que o pH do meio até 10 horas de fermentação ainda não atingiu valores muito baixos, foi escolhido esse tempo para cultura mista.

4.4.11 Estabilidade Físico-Química e Microbiológica da Bebida Fermentada com Cultura Mista

A bebida fermentada produzida de acordo com o item 3.6.8 foi armazenada sob refrigeração a 5 °C. No primeiro e no 28º dia de estocagem foram determinados os números de células viáveis de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e o pH da bebida. Os resultados são mostrados na figura 76.

FIGURA 76 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Lactobacillus* E *Bifidobacterium* DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO



Observa-se que a porcentagem de morte celular foi baixa para os dois gêneros utilizados na fermentação. O número de células viáveis de *Lactobacillus* diminuiu 4,5%, passando de $1,1 \times 10^9$ para $4,3 \times 10^8$ UFC/mL. Para o *Bifidobacterium*, a

viabilidade diminuiu 5,2% durante o período em que a bebida foi mantida sob refrigeração, variando de $5,0 \times 10^7$ para $2,0 \times 10^7$ UFC/mL. O pH da bebida variou de 4,70 a 3,65 durante este período. A baixa redução no número de células viáveis do *Bifidobacterium* mostrou que esta espécie é resistente, mesmo em pH inferior a 4,5.

Como os microrganismos probióticos devem estar presentes em grande quantidade, geralmente acima de um bilhão por dose diária ingerida (FAO/WHO, 2001), mesmo após 28 dias de armazenamento sob refrigeração, a ingestão de menos de 10 mL por dia da bebida fermentada com cultura mista supriria esta necessidade. Considerando apenas da cultura BFL-9, seria necessário ingerir pelo menos 50 mL da bebida fermentada, o que não é um volume muito elevado já que os leites fermentados disponíveis no mercado geralmente são comercializados em embalagens de 80 mL.

4.4.12 Análise Sensorial da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

A figura 77 mostra o aspecto da bebida fermentada à base de água de coco após 10 horas de fermentação do meio preparado conforme o item 3.6.8.

FIGURA 77 – ASPECTO VISUAL DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO



A análise sensorial da bebida foi realizada conforme descrito no item 3.6.13. Os julgadores avaliaram o aspecto, cor, aroma e sabor da água de coco (A), da bebida fermentada à base de água de coco (B) e da mesma adicionada de 3% de açúcar e

0,005% de aroma artificial de coco (C). Os resultados são apresentados na tabela 21 e na figura 78.

TABELA 21 – MÉDIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO SENSORIAL DA ÁGUA DE COCO E DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO SEM E COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR E AROMA

ATRIBUTO	Amostra		
	A	B	C
Aspecto	5,65 ± 0,99 ^a	4,35 ± 1,50 ^b	4,50 ± 1,40 ^b
Cor	5,70 ± 1,03 ^a	3,90 ± 1,45 ^b	4,35 ± 1,27 ^b
Aroma	4,80 ± 1,06 ^a	3,10 ± 1,07 ^b	4,00 ± 1,38 ^c
Sabor	5,20 ± 0,95 ^a	4,05 ± 1,50 ^b	5,55 ± 1,00 ^a
Avaliação geral	5,50 ± 0,83 ^a	3,75 ± 1,21 ^b	5,15 ± 1,35 ^a

NOTA: letras diferentes na mesma linha significam diferença significativa com $p < 0,05$.

Observa-se na tabela 21 que o aspecto, cor e aroma das bebidas fermentadas apresentaram diferença significativa em relação à água de coco. Porém, os atributos sabor e avaliação global da bebida fermentada adicionada de açúcar e aroma não foram estatisticamente diferentes do padrão (A), conforme apresentado no anexo 3.

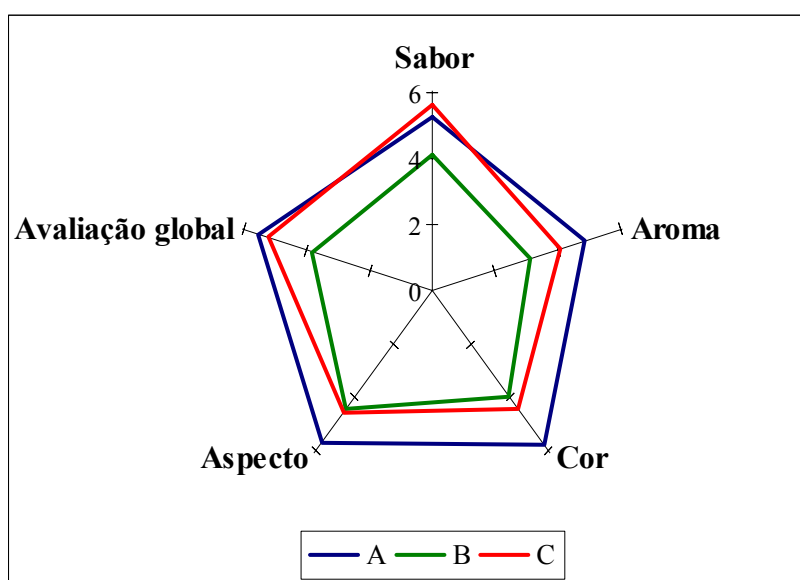
Os escores médios obtidos para o aspecto da bebida fermentada foram inferiores para as amostras B e C muito provavelmente devido à presença de células em suspensão que causam turbidez no meio. Este fato não ocorre com a amostra padrão (A) que é extremamente límpida.

No atributo cor, as médias de B e C foram inferiores ao padrão provavelmente também devido à turbidez e à leve coloração amarelada proveniente dos suplementos extrato de levedura e proteína de soja hidrolisada e do próprio inóculo.

Durante a fermentação para produção da bebida ocorre perda do aroma natural da água de coco. Assim, fez-se necessário a adição de aroma artificial para tentar melhorar esse atributo. Observa-se na tabela 21 que neste quesito houve diferença significativa também entre as amostras B e C. Embora a média para a amostra C tenha sido superior à B, ainda assim ficou abaixo da média do padrão. Este problema pode

ser facilmente corrigido com o aumento da concentração de aroma. Segundo a Resolução CNS/MS nº 4 de 24 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988), não há um limite para o uso de aroma artificial em iogurtes, leites fermentados, refrescos ou outras bebidas.

FIGURA 78 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE COCO E DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO SEM E COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR E AROMA



Quanto ao sabor, a amostra C apresentou média superior, mas não foi estatisticamente diferente do padrão. Na avaliação geral das amostras também não houve diferença significativa entre A e C.

Todas as médias da amostra B foram inferiores às da amostra C. Isto quer dizer que nesta avaliação sensorial os julgadores se deixaram influenciar principalmente pelo sabor e aroma da bebida, já que o aspecto e a cor da bebida B receberam notas inferiores às da bebida C e ambas eram exatamente iguais nestes dois atributos.

A figura 78 mostra que a bebida fermentada sem adição de nenhum ingrediente (B) não teve aprovação por parte dos julgadores. Porém, adicionada de açúcar e aroma de coco apresentou ótimo sabor e uma boa avaliação global. O aroma

da amostra C pode ser melhorado aumentando a concentração deste aditivo para 0,01% (v/v). As notas inferiores ao padrão (A) para cor e aspecto de C de nenhuma maneira influenciam negativamente na qualidade sensorial da bebida já que não existe no mercado bebida probiótica de origem vegetal para ser utilizada como padrão de comparação.

Os julgadores compararam ainda o sabor das bebidas B e C com o padrão A. Os resultados são mostrados na tabela 22. As médias das duas amostras foram estatisticamente diferentes (anexo 4).

TABELA 22 – MÉDIAS OBTIDAS NA COMPARAÇÃO DO SABOR ENTRE AS BEBIDAS FERMENTADAS À BASE DE ÁGUA DE COCO COM A ÁGUA DE COCO SEM E COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR E AROMA

ATRIBUTO	Amostra	
	B	C
Sabor	2,45 ± 1,15 ^a	4,05 ± 1,19 ^b

NOTA: letras diferentes na mesma linha significam diferença significativa com $p < 0,05$.

Considerando que nota 3 significava sabor igual ao do padrão, acima de 3 era melhor e abaixo de 3 era pior que o padrão (anexo 2), os julgadores novamente reprovaram o sabor da amostra B (média 2,45), mas aprovaram o sabor da amostra C (média 4,05).

4.4.13 Avaliação Microbiológica da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

Na avaliação microbiológica da bebida fermentada à base de água de coco, foi considerada a similaridade da natureza e do processamento do produto, como base para seu enquadramento nos padrões estabelecidos para um produto similar, devido ao fato da referida bebida ser um produto novo (BRASIL, 2001).

A bebida fermentada foi comparada aos produtos apresentados no quadro 15 por conter bactérias lácticas viáveis e por ser um produto à base de água de coco. Os limites apresentados no quadro 15 estão de acordo com a Resolução n. 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

A avaliação microbiológica de *Salmonella* sp e Coliformes a 35° C e 45° C foi realizada no 6º dia (anexo 5) e no 35º dia (anexo 6) após a data de produção da bebida fermentada à base de água de coco. Os resultados apresentados nos anexos 5 e 6 mostram que nas duas ocasiões houve ausência de crescimento de *Salmonella* e o número mais provável de Coliformes a 35° C e a 45° C por grama de produto foi inferior a 0,03, o que significa ausência de crescimento microbiano. Sendo assim, as amostras da bebida fermentada à base de água de coco estavam de acordo com os padrões legais vigentes.

QUADRO 15 – PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS SIMILARES À BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO

Grupo de alimentos	Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa
Leite fermentado, com ou sem adições, refrigerado, e com bactérias lácticas viáveis nos números mínimos.	Coliformes a 45° C/g	10
Sucos pasteurizados e refrigerados, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em mistura.	Coliformes a 45° C/mL Salmonella sp/25 mL	10 Ausência

FONTE: BRASIL, 2001.

4.4.14 Caracterização da Bebida Fermentada à Base de Água de Coco

A água de coco apresenta, em média, 20 quilocalorias em cada 100 mL (DE CARVALHO *et al.*, 2006). Na produção da bebida fermentada, a água de coco é adicionada de fontes extras de carbono e nitrogênio e adoçada com açúcar. Foram determinados o teor de proteínas e a quantidade de glicose e frutose na bebida fermentada à base de água de coco. Após 10 horas de fermentação, a bebida apresentou 0,82 g/L de proteínas; 32,2 g/L de glicose e 20,78 g/L de frutose. A bebida foi ainda adicionada de 3% de sacarose. Foi realizado um balanço energético para calcular o valor calórico. Os dados são apresentados na tabela 23.

A bebida fermentada à base de água de coco apresenta em torno de 33,5 quilocalorias em cada 100g. De acordo com os dados da tabela 24, este valor é

aproximadamente metade do valor calórico médio dos leites fermentados disponíveis no mercado.

TABELA 23 – BALANÇO ENERGÉTICO PARA O CÁLCULO DO VALOR CALÓRICO DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO

Componente	Quantidade em 100 g (g)	Fator (kcal/g)	Valor calórico em 100g (kcal)
Proteínas	0,082	4	0,33
Glicose	3,22	4	12,88
Frutose	2,08	4	8,32
Sacarose	3,00	4	12,00
Total	-	-	33,53

Observa-se na tabela 24 o valor calórico de um iogurte *light* (44 kcal/100g), com 0% de gordura: iogurte *light* Dietalat. Ainda assim, este valor é superior ao valor calórico da bebida fermentada à base de água de coco (33,53 kcal/100g).

TABELA 24 – VALOR CALÓRICO DE BEBIDAS PROBIÓTICAS DISPONÍVEIS NO MERCADO

Produto	Fabricante	Valor calórico/100g (kcal)
Iogurte Activia Natural	Danone	78
Iogurte desnatado Bio Fibras	Batavo	81
Iogurte <i>light</i> Dietalat	Parmalat	44
Leite fermentado Batavito	Batavo	64
Leite fermentado Chamyto	Nestlé	73
Leite fermentado Parmalat	Parmalat	63
Leite fermentado Vigor Club	Vigor	75
Leite fermentado Yakult	Yakult	75
Média		69

Com base nos dados apresentados, a bebida fermentada à base de água de coco é caracteriza como uma bebida probiótica de baixa caloria.

5 CONCLUSÕES

Foram isoladas sete culturas da microflora do coco verde. Entre estas, a cepa AC-1 foi selecionada por apresentar características probiótica relevantes e não produzir CO₂.

Na caracterização das culturas, AC-1 foi identificada como *Lactobacillus plantarum* 1 e B-7 como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1 através do perfil de consumo de diferentes fontes de carbono utilizando galerias API 50 CH (BioMérieux, França). Pela identificação molecular, a porcentagem de similaridade com as cepas referência foi baixa. AC-1 apresentou 62,7% de similaridade com *Lactobacillus sakei* e com *Lactobacillus rhamnosus* enquanto B-7 foi apenas 35% similar ao *Lactobacillus acidophilus*.

Na produção da bebida fermentada à base de água de coco foram testadas diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Os maiores incrementos de densidade óptica de AC-1 foram atingidos após 8 horas de fermentação a 37 °C com água de coco adicionada de 0,07% de extrato de levedura, 2 mL % de proteína de soja hidrolisada e 1,4% de sacarose. O pH inicial do meio à base de água de coco foi otimizado em 4,5 e a taxa de inoculação em 3% (v/v).

Utilizando cultura mista de AC-1, B-7 e BFL-9, na proporção de 1:1:1, os maiores incrementos de densidade óptica foram obtidos em meio à base de água de coco adicionado de 0,12% de extrato de levedura, 3,5 mL % de proteína de soja hidrolisada e 2,3% de sacarose, após 8 horas de fermentação a 37 °C. A taxa de inoculação utilizada foi de 3% (v/v) e, neste caso, o pH inicial foi de 6,0 devido a presença do *Bifidobacterium*.

Embora a quantidade ótima de extrato de levedura tenha sido de 0,12% para cultura mista, na produção da bebida probiótica à base de água de coco foi utilizada 0,05% para evitar a permanência de sabor residual no fermentado. Um estudo cinético nas condições mencionadas apontou um tempo ótimo para fermentação com cultura mista de 10 horas. Foram atingidas contagens de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* de $1,1 \times 10^9$ e 5×10^7 UFC/mL, respectivamente.

Ao final de 28 dias de armazenamento sob refrigeração, a bebida apresentou contagem celular desejável de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de $4,3 \times 10^8$ e 2×10^7 UFC/mL, respectivamente. Considerando que para ter efeito probiótico estes microrganismos devam ser ingeridos diariamente na quantidade de pelos menos 10^9 UFC, o consumo de 50 mL da bebida fermentada por dia supriria essa condição, inclusive do *Bifidobacterium* cuja contagem foi bem inferior.

Na avaliação sensorial, a bebida fermentada adicionada de 3% de açúcar e 0,005% de aroma de coco teve aceitabilidade por parte dos provadores.

A análise microbiológica realizada no 6º e no 35º dias após o preparo da bebida apontou ausência de *Salmonella* sp. e de Coliformes a 35º C e a 45º C. Assim, as amostras da bebida fermentada à base de água de coco estavam de acordo com os padrões legais vigentes.

No balanço energético realizado para calcular o valor calórico, a bebida fermentada à base de água de coco, adicionada de açúcar, apresentou apenas 33,5 kcal/100g, valor este bem inferior ao valor calórico de produtos probióticos disponíveis no mercado, o que caracteriza como bebida de baixa caloria.

A bebida fermentada à base de água de coco, além de agregar valor a este novo substrato não lácteo, introduz um novo veículo para o consumo de bactérias probióticas, especialmente para consumidores vegetarianos e que apresentam intolerância à lactose.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Análise sensorial**. PN 13:014.01-015, São Paulo, 1994.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17. ed. Washington, D.C.:AOAC, 2000. 1410 p.
- ARAGÃO, F. B.; LOIOLA, C. M.; CABUI, E. V. F.; ARAGÃO, W. M. **Produção de água de coco de cultivares de coqueiro verde**. Comunicado Técnico n. 42. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>> Acesso em: 24 abr. 2007.
- ARAGÃO, W. M. **A importância do coqueiro-anão verde**. Artigos Embrapa. Publicado em 20 jun. 2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>> Acesso em: 27 jun. 2004.
- ARAGÃO, W. M. **O potencial do coqueiro híbrido para a cocoicultura brasileira**. Artigos Embrapa. Publicado em 06 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>> Acesso em: 09 maio 2004.
- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. **Água-de-coco**. Série Documentos n. 24. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001.
- ARAGÃO, W. M.; RAMOS, A. M.; HELVÉCIO, J. S. **Caracterização morfológica e química da água de coco de cultivares de coqueiro**. Anais do Seminário de Pesquisa FAP-SE, p. 1-4, 2003.
- ARAGÃO, W. M.; ROSA, M. F.; CABRAL, L. M. C. **Desenvolvimento de tecnologias pré e pós-colheita para maximização agroindustrial da água-de-coco anão**. Subprojeto de pesquisa. Aracaju: Embrapa CPATC/CNPAT/CTAA, 1998.
- BATISH, V. K.; GROVER, S. Fermented Milk Products, p. 201-209. In: PANDEY, A. (Ed.) **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. USA: The Haworth Press, 2004. p. 201-210.
- BATTCKOCK, M.; AZAM-ALI, SUE. Fermented fruits and vegetables. A global perspective. **FAO Agricultural Services Bulletin**, n. 134, 1998. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 21 nov. 2005.
- BERGONIA, H. A. Reverse osmosis of coconut water through cellulose membrane. **Philippine Journal of Food Science and Technology**, v. 6, p. 31-40, 1982.
- BERNER, L. A.; O'DONNELL, J. A. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 355-362, 1998.

BIOMERIEUX. Apiweb. Api 50 CHL v.5.1. Disponível em: <<http://apiweb.biomerieux.com>> Acesso em: 27 fev. 2007.

BIOSENTEC. Enzymatic kit. D-lactic/L-lactic acids. Cat. n. 023. Disponível em: <<http://www.biosentec.fr>> Acesso em: 15 jan. 2007.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; HEINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.

BRASIL. Resolução CNS/MS n. 4, de 24 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez. 1988.

BRASIL. Ministério da Integração Regional. **Coco verde**. FrutiSéries 3 – São Paulo. Brasília, SRH-IIICA, 1998.

BRASIL. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 maio 1999a.

BRASIL. Portaria n. 19, de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 maio 1999b.

BRASIL. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.

BRASIL. Instrução Normativa n. 39 de 28 de maio de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 maio 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas. Agricultura brasileira em números. **Anuário 2005**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 23 fev. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **VisaLegis – Glossário de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 03 out. 2007.

BRITO, N. M.; NAVICKIENE, S.; POLESE, L.; JARDIM, E. F. G.; ABAKERLI, R. B.; RIBEIRO, M. L. Determination of pesticide residues in coconut water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 957, p. 201-209, 2002.

CABRAL, L. M. C. Estabilização da água de coco verde por meio de filtração com membranas. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.) **Coco: pós-colheita**. Brasília: Embrapa, Série Frutas do Brasil, n. 29, 2002. p. 54-57.

CAMARGO, L. A última evolução. **Veja**, São Paulo: Ed. Abril, ano 39, n. 50, p. 112-114, 20 dez. 2006.

CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V.; GLÓRIA, M. M. B. A. Green coconut water quality. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p. 487-500, 1996.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

CARRIJO, O. A.; De LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 533-535, 2002.

CERNING, J. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. In: DE ROISSART, H.; LUQUET, F. M. (Eds). **Bactéries Lactiques – Aspects fondamentaux et technologiques**. Ed. Loriga, v. 1, 1994. p. 309-329.

CHOU, L. S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 23-31, 1999.

COCCONCELLI, P. S.; PORRO, D.; GALANDINI, S.; SENINI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 376-379, 1995.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbial Reviews**, v. 46, p. 269-280, 1987.

CONWAY, P. L.; GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1-12, 1987.

CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N.; GOBBETTI, M. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*)

sourdoughs of Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 95-104, 2001.

COSTA, L. M. C.; MAIA, G. A.; DA COSTA, J. M. C.; DE FIGUEIREDO, R. W.; DE SOUSA, P. H. M. Avaliação de água-de-coco obtida por diferentes métodos de conservação. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, n. 6, p. 1239-1247, 2005.

CRITTENDEN, R. G. Prebiotics. In: TANNOCK, G. W. (Ed.) **Probiotics: a critical review**, Wymondham (UK): Horizon Scientific Press, 1999. p. 141-156.

CUENCA, M. A. G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Eds.) **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 1998. p.17-56.

CULLINGS, K.W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 233-240, 1992.

DA COSTA, J. M. C.; ALVES, M. C. S.; CLEMENTE, E.; FELIPE, E. M. F. Características físico-químicas e minerais de água de coco de frutos da variedade anã amarelo em diferentes períodos de maturação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p. 173-177, 2006.

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, v. 43, p. 164-167, 1989.

DE CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; DE SOUZA, P. H. M.; MAIA JR., G. A. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 437-452, 2006.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DEL ROSARIO, E. J.; PAPA, G. M.; GERGONIA, H. A.; REYES, C. S. Concentration of coconut water by plate and frame reverse osmosis using cellulose acetate membrane. **ASEAN Food Journal**, v. 2, p. 19-24, 1986.

DELLAGLIO, F.; DE ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M. C.; JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: DE ROISSART, H.; LUQUET, F. M. (Eds). **Bactéries Lactiques – Aspects fondamentaux et technologiques**. Ed. Loric, v. 1, 1994. p. 25-116.

DOORES, S. Organic Acids. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Eds.). **Antimicrobials in foods**, 2. ed., New York: Marcel Dkker Inc., 1993. p. 95-136

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUTTA, S. **Processing of green coconut water for bottling as a soft drink**. Kharagpur, India. 1995. Thesis. Indian Institute of Technology. Department of Agricultural Engineering.

ELEY, R. **Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana**. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha, 1992. 208p.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report**. Cordoba - Argentina, 2001.

FAOSTAT, 2005. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em 01 mar. 2007.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados. Aspectos bioquímicos e tecnológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1987.

FILHO, W. G. V. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 550 p.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Série Documentos n. 94. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. In vitro investigation of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 67-75, 2002

FOX, P. F. Cheese: an overview. In: FOX, P. F. (Ed.) **Cheese; Chemistry, Physics and Microbiology**. Chapman & Hall, London, England, 1993. p. 1-36.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

GALEAZZI, M. A. M. Comportamento das polifenoloxidasas em alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 34, n. 2, p. 269-289, 1984.

GALIZA, M. **Água de coco em pó facilita a difusão dos benefícios do produto “in natura”**. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Sala de Imprensa, Notícias. Disponível em: <<http://www.cnpq.br>> Acesso em: 29 jun. 2004.

GIBSON, G. R.; COLINS, M. D. O conceito da microbiota colônica equilibrada, os probióticos e os simbióticos. In: **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal**. Vevey: Nestlé. Resumo do 42º Seminário de Nestlé Nutrition. 1998.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. Symposium - Probiotic bacteria: implications for human health. **The Journal of Nutrition**, v. 130 (suppl.), p. 391S-395S, 2000.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GILLILAND, S. E.; WALKER, D. K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. **Journal of Dairy Science**, EUA, v. 73, p. 905-911, 1990.

GIRAUD, E. **Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté**. 1992. 139 p. Thèse, Université de Provence aix-Marseille.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 287-292, 1999.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GORBACH, S. L. Probiotics in the third millennium. **Digestive and Liver Disease**, Itália, v. 34, suppl. 2, p. S2-S7, 2002.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 237-238, 1998.

GHERNA, R. L. Culture preservation, bacteria, fungi, yeast, and cell lines. In: FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. (Eds.) **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation**. Canada: John Wiley & Sons Inc. 1999. p. 786-793.

GUYOT, J. P.; CALDERON, M.; MORLON-GUYOT, J. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 176-182, 2000.

HAMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.) **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. London: Chapman & Hall, v. 2, 1995. p. 19-54.

HAMILTON-MILLER, J. M. T.; SHAH, S.; WINKLER, J. T. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutrition**, v. 2, p. 223-229, 1999.

HERBÁRIO. Industrialização do coco para o mercado internacional. Set. 2002. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br>> Acesso em: 02 mar. 2007.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**, v. 22, p. 455-459, 2005.

HILLIAM, M. Functional food. How big is the market? **The World of Food Ingredients**, v. 12, p. 50-53, 2000.

HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 1246-1247, 1982.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116, 2002.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. São Paulo, 4. ed., 2005.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 171-200, 1995.

JACKSON, J. C.; GORDON, A.; WIZZARD, G.; McCOOK, K.; ROLLE, R. Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 9, p. 1049-1052, 2004.

JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C.; NARAYANAN, C. S.; MATHEW, A. G. Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. **Oléagineux**, Paris, v. 43, n. 11, p. 409-414, 1998.

JÚLIO, C. A. Os quatro Ps da Danone. **HSN Management**, ano 7, n. 39, 2003.

KHALED, A. K. D.; NEILAN, B. A.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P. L. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 191-197, 1997.

KLAENHAMMER, T. R.; KLEEMAN, E. G. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lb. acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 1461-1467, 1981.

KLAVER, F. A. M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 27, p. 151-164, 1993.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, p. 74-81, 2006.

LIU, S. -Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 115-131, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 72-77, 2005.

MAKRAS, L.; DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1049-1057, 2006.

MASCO, L.; VENTURA, M.; ZINK, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1137-1143, 2004.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 281- 295, 2005.

MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet**, v. 2, p. 5-7, 1947.

MEANCE, S.; CAYUELA, C.; TURCHET, P. A fermented milk with a *Bifidobacterium* probiotic strain DN-173010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 13, p. 217-222, 2001.

MEDINA, L. M.; JORDANO, R. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 731-733, 1994.

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C.; KAUFMANN, P.; DASEN, G.; WENGER, S.; TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic & Applied Microbiology**, v. 20, p. 57-64, 1997.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de avaliação sensorial**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, CEPPA, 2.ed., 1984. 101p.

O’SULLIVAN, M. G.; THORNTON, G. M.; O’SULLIVAN, G. C.; COLLINS, J. K. Probiotic bacteria: myth or reality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, p. 309-314, 1992.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

PANCHENIAK, E. F. R. **Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos**. Curitiba, 2005. 198 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

PANCHENIAK, E. F. R.; SOCCOL, C. R. Biochemical characterization and identification of probiotic *Lactobacillus* for swine. **Boletim CEPPA**, v. 23, p. 299-310 2005.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PASSOS, E. E. M. Morfologia do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Eds.) **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 1998. p. 56-64.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, 2007 (*in press*). Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 16 nov. 2007.

PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P. K. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 993-1002, 1999.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 849-859, 2003.

RASTALL, R. A.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 490-496, 2002.

RAY, B. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservative. In: RAY, B.; DAESCHEL, M. (Eds.) **Food biopreservatives of microbial origin**. Florida: CRC Press, v. 8, 1992. p.177-205.

REBELLO, F. K.; REALE FILHO, H. B.; FIGUEIREDO, R. N. C. **Diagnóstico e perspectiva econômica do coqueiro no Estado do Pará**. Belém, 2000. 54 f. Monografia (Curso de Especialização em Agricultura Integrada na Amazônia). Faculdade de Ciências Agrárias do Pará.

RGNUTRI – Consultoria nutricional. São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.rgnutri.com.br>> Acesso em: 30 mar. 2004.

RHEE, S. K.; PACK, M. Y. Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 144, p. 217- 221,1980.

ROBIJN, G. W.; WIENK, H. L. J.; VAN DEN BERG, D. J. C.; HAAS, H.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Structural studies of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. **Carbohydrate Research**, v. 285, p. 129-139, 1996.

ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. 314p.

ROGERS, L. A.; WHITTIER, E. D. Limiting factors in lactic fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 16, p. 211-229, 1928.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system**, versão 2.1, Exeter Software: Setauket, NY. 2000.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. Processos convencionais de conservação de água de coco. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.) **Coco: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnologia, Série Frutas do Brasil, n. 29, 2002. p. 42-53.

RUSSEL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 205-234, 1998.

RYCROFT, C. E.; JONES, M. R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 878-887, 2001.

SAABOR, A.; LOPES, L. H. S.; CUNHA, M. M.; FERNANDES, C. Ministério da Integração Nacional, Secretaria de Infra-Estrutura Hídrica, Departamento de Projetos Especiais. **FrutiSéries 3 – Coco-Verde – Minas Gerais**. Brasília, 2000. Disponível em: <<http://www.irrigar.org.br>> Acesso em: 09 maio 2004.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATILLA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W. M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.-E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 93-106, 1998.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 47, p. 58-60, 1994.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 341-347, 1998.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. p.1418-1434. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. 472 p.

SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.) **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, v. 2, p. 7-18, 1995.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73 (suppl), p. 361S-364S, 2001.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405-440, 2004.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. v. 2, 1995. p. 279-306.

SREBERNICH, S. M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedades gigante e híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco**. Campinas, 1998. 189 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.

STANIER, R. Y.; ADELBERG, E. A.; DOUDOROFF, M.; **Mundo dos micróbios**. São Paulo: Edgard Blucher, 2. ed., 1976. 741 p.

STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198-203, 2005.

STATISOFT. **Statística for windows versão 5.1**. Inc. Tulsa, OK 74104 USA, 1998.

STENDID, J.; KARLSSON, J. O.; HOGBERG, N. Intraspecific genetic variation in *Heterobasidium annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. **Mycology Research**, v. 98, p. 57-63, 1994.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 348-359, 2004.

THOMAS, T. D.; ELLWOOD, D. C.; LONGYEAR, V.M.C. Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 109-117, 1979.

THOMAS, T. D.; TURNER, K. W.; CROW, V. L. Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products, and regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 144, p. 672-682, 1980.

TODAR, K. Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. 2005. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net>> Acesso em: 11 nov. 2005.

TORO, C. R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. Curitiba, 2005. 173 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, UFPR.

TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. In: TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. **Os probióticos e a saúde infantil**. São Paulo: Nestlé, 2000.

TSENG, C. -P.; MONTVILLE, T. J. Enzyme activities affecting end product distribution by *Lactobacillus plantarum* in response to changes in pH and O₂. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2761-2763, 1990.

VENTURA, M.; ZINK, R. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6429-6434, 2002.

WIJTZES, T.; BRUGGEMAN, M. R., NOUT, M. J. R.; ZWIETERING, M. H. A computerized system for the identification of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 54-70, 1997.

WOODROOF, J.G. **Coconuts: production, processing, products**. AVI Publishing Company, 2. ed., Westport, Connecticut, 1979. 307 p.

ZAPPAROLI, G.; REGUANT, C.; BORDONS, A.; TORRIANI, S. ; DELLAGLIO, F. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. **Current Microbiology**, v. 40, p. 315-355, 2000.

ZHU, W. M.; LIU, W.; WU, D. Q. Isolation and characterization of a new bacteriocin form *Lactobacillus gasseri* KT7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 877-886, 2000.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 473-479, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1	– PEDIDO DE PATENTE INDUSTRIAL DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS.....	157
ANEXO 2	– FICHA DE RESPOSTAS APRESENTADA AOS PROVADORES NA AVALIAÇÃO SENSORIAL DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	160
ANEXO 3	– ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES OBTIDOS NOS ATRIBUTOS AVALIADOS NA ANÁLISE SENSORIAL DA BEBIDA FERMENTADA À BASE DE ÁGUA DE COCO.....	161
ANEXO 4	– ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES OBTIDOS NA COMPARAÇÃO DO SABOR DAS BEBIDAS FERMENTADAS À BASE DE ÁGUA DE COCO COM O PADRÃO.....	163
ANEXO 5	– ANÁLISE MICROBIOLÓGICA REALIZADA NO SEXTO DIA APÓS O PREPARO DA BEBIDA.....	164
ANEXO 6	– ANÁLISE MICROBIOLÓGICA REALIZADA APÓS 35 DIAS DO PREPARO DA BEBIDA.....	165

Anexo 1 – Pedido de patente industrial da bebida fermentada à base de água de coco com propriedades probióticas.

LPI INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 10/07/2007 15:48 DEPR
 015070003296
 0000220704559169

Protocolo

Número (21)

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	depósito / /
	Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

1.2 Qualificação: **Autarquia Federal** 1.3 CGC/CPF: **75.095.679000149**

1.4 Endereço completo: **Rua Dr. Faivre, 405, 1º andar, Centro, Curitiba**

1.5 Telefone: **41.3360-5379**

FAX: **41.3360-5379**

☐ continua em folha anexa

2. **Natureza:**

☒ 2.1 Invenção ☐ 2.1.1. Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. **Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**
"PROCESSO TECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE UMA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE
ÁGUA DE COCO COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS"

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão** do pedido nº. , de .

5. **Prioridade Interna** - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito

Data de Depósito

(66)

6. **Prioridade** - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

☐ continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
 (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: **Carlos Ricardo Soccol**

7.2 Qualificação: **Pós-Doutor**

Formulário 1.01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

7.3 Endereço: R. Pedro Demeterco, 1020, Curitiba-PR

7.4 CEP: 51530320

7.5 Telefone (41) 3267-5720

☒ continua em folha anexa**8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**☐ em anexo**9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):☐ em anexo**10. Procurador (74):**

10.1 Nome

CPF/CGC:

10.2 Endereço:

10.3 CEP:

10.4 Telefone

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	2 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	6 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	4 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	3 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar): Cópia de nomeação/anexos				2 fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				18 fls;

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Prof. Dr. Carlos Augusto Moreira Junior
Reitor - UFPR

ANEXO DE CONTINUAÇÃO – FORMULÁRIO 1.01

7. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: Flávera Camargo Prado

7.2 Qualificação: Mestre

7.3 Endereço: R. São Tomé, 35, sb. 03, Curitiba-PR

7.4 CEP: 81540320

7.5 Telefone: (41) 3434-4774

7. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: Jose Luis Parada

7.2 Qualificação: Doutor

7.3 Endereço: R. João Pontoni, 98, ap.63, Curitiba-PR

7.4 CEP: 80050-490

7.5 Telefone: (41) 3363-8871



Anexo 2 – Ficha de respostas apresentada aos provadores na avaliação sensorial da bebida fermentada à base de água de coco.

Sexo: _____

Idade: _____

Você está recebendo uma amostra padrão (736) e duas amostras codificadas. Avalie a intensidade de cada atributo de acordo com a escala abaixo:

- 1- Desgostei extremamente
- 2- Desgostei muito
- 3- Desgostei ligeiramente
- 4- Indiferente
- 5- Gostei ligeiramente
- 6- Gostei muito
- 7- Gostei extremamente

Aspecto	Amostra nº 763	Amostra nº 581	Amostra nº 947
Cor	Amostra nº 763	Amostra nº 581	Amostra nº 947
Aroma	Amostra nº 763	Amostra nº 581	Amostra nº 947
Sabor	Amostra nº 763	Amostra nº 581	Amostra nº 947
Avaliação global	Amostra nº 763	Amostra nº 581	Amostra nº 947

Compare cada amostra codificada com a amostra padrão (736) e identifique se é melhor, igual ou pior que o padrão em relação ao SABOR. Em seguida, assinale o grau de diferença de acordo com a escala abaixo:

- 1- Muito pior que o padrão
- 2- Ligeiramente pior que o padrão
- 3- Nenhuma diferença do padrão
- 4- Ligeiramente melhor que o padrão
- 5- Muito melhor que o padrão

Amostra	Valor
736	Padrão
581	
947	

Anexo 3 – Análise de variância dos valores obtidos nos atributos avaliados na análise sensorial da bebida fermentada à base de água de coco.

Atributo: ASPECTO

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostra	2	20,23	10,12	9,51**
Julgador	19	57,67	3,04	2,85 ^{ns}
Resíduo	38	40,43	1,06	
Total	59	118,33		

**significativo a 1% de probabilidade

^{ns} - não significativo

Atributo: COR

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostra	2	35,10	17,55	11,86**
Julgador	19	34,32	1,81	1,22 ^{ns}
Resíduo	38	56,23	1,48	
Total	59	125,64		

**significativo a 1% de probabilidade

^{ns} - não significativo

Atributo: AROMA

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostra	2	28,93	14,47	11,20**
Julgador	19	29,93	1,58	1,22 ^{ns}
Resíduo	38	49,07	1,29	
Total	59	125,64		

**significativo a 1% de probabilidade

^{ns} - não significativo

Atributo: SABOR

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostra	2	24,63	12,32	9,48**
Julgador	19	29,73	1,56	1,20 ^{ns}
Resíduo	38	49,37	1,30	
Total	59	103,73		

** - significativo a 1% de probabilidade

^{ns} - não significativo

Atributo: AVALIAÇÃO GERAL

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostra	2	34,30	17,15	16,14**
Julgador	19	34,93	1,84	1,73 ^{ns}
Resíduo	38	40,37	1,06	
Total	59	109,60		

**significativo a 1% de probabilidade

^{ns} - não significativo

Anexo 4 – Análise de variância dos valores obtidos na comparação do sabor das bebidas fermentadas à base de água de coco com o padrão.

Atributo: SABOR

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostra	1	25,60	25,60	23,84**
Julgador	19	31,50	1,66	1,54 ^{ns}
Resíduo	19	20,40	1,07	
Total	39	77,50		

**significativo a 1% de probabilidade

^{ns} - não significativo

Anexo 5 – Análise microbiológica realizada no sexto dia após o preparo da bebida.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS MEDIANEIRA
LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-
QUÍMICAS DE ALIMENTOS E ÁGUA - LAMAG



FUNDAÇÃO DE APOIO A EDUCAÇÃO, PESQUISA E
DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DA
UTFPR CAMPUS MEDIANEIRA

Credenciado pela Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento - SEAB/PR nº 03/2007

CERTIFICADO DE ENSAIO ANALÍTICO

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº: 781/07

AMOSTRA: Bebida Fermentada a Base de água de coco – Fab. 24/10/07

INTERESSADO: Flávera Camargo Prado

ENDEREÇO: Medianeira – PR

DATA DA AMOSTRAGEM: 29/10/07

DATA DA ENTREGA DA AMOSTRA: 29/10/07

IMPRESSÃO DO CERTIFICADO: 05/11/07

PARÂMETRO ANALISADOS

ANÁLISE	RESULTADO
Contagem de Coliformes a 35°C	NMP/g < 0,03
Contagem de Coliformes a 45°C	NMP/g < 0,03
Pesquisa de <i>Salmonella</i>	Ausência em 25g

- Metodologia: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003.
- A presente análise tem seu valor restrito a amostra entregue no laboratório.
- A reprodução total ou parcial deste certificado só poderá ser feita sob autorização expressa do Responsável Técnico do Laboratório.
- UFC/g = Unidade Formadora de Colônia por grama.
- < 0,03 – Indica ausência de crescimento

Ademir Mattana
CRQ 09902520

LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE ALIMENTOS E ÁGUA – UTFPR
Av. Brasil, 4232 Parque Independência – Medianeira – PR 85884-000 Cx. Postal: 271 Telefone: 45 3240-8054
Reg. CRQ IX reg. 02332 – Resp. Téc. Ademir Mattana - IX reg. 09902520 – CNPJ 02032297/0002-83 Insc. Mun. 1542/9
Email: lamag-md@utfpr.edu.br

Anexo 6 – Análise microbiológica realizada após 35 dias do preparo da bebida.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS MEDIANEIRA
LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-
QUÍMICAS DE ALIMENTOS E ÁGUA - LAMAG



FUNDAÇÃO DE APOIO A EDUCAÇÃO, PESQUISA E
DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DA
UTFPR CAMPUS MEDIANEIRA

Credenciado pela Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento - SEAB/PR nº 03/2007

CERTIFICADO DE ENSAIO ANALÍTICO

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº: 861/07
AMOSTRA: Bebida Fermentada a Base de água de coco – Fab. 24/10/07
INTERESSADO: Flávera Camargo Prado
ENDEREÇO: Medianeira – PR
DATA DA AMOSTRAGEM: 27/11/07
DATA DA ENTREGA DA AMOSTRA: 27/11/07
IMPRESSÃO DO CERTIFICADO: 30/11/07

PARÂMETRO ANALISADOS

ANÁLISE	RESULTADO
Contagem de Coliformes a 35°C	NMP/g < 0,03
Contagem de Coliformes a 45°C	NMP/g < 0,03
Pesquisa de <i>Salmonella</i>	Ausência em 25g

- Metodologia: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003.
- A presente análise tem seu valor restrito a amostra entregue no laboratório.
- A reprodução total ou parcial deste certificado só poderá ser feita sob autorização expressa do Responsável Técnico do Laboratório.
- UFC/g = Unidade Formadora de Colônia por grama.
- < 0,03 – Indica ausência de crescimento

Ademir Mattana
CRQ 09902520

LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE ALIMENTOS E ÁGUA – UTFPR
Av. Brasil, 4232 Parque Independência – Medianeira – PR 85884-000 Cx. Postal: 271 Telefone: 45 3240-8054
Reg. CRQ IX reg. 02332 – Resp. Téc. Ademir Mattana - IX reg. 09902520 – CNPJ 02032297/0002-83 Insc. Mun. 1542/9
Email: lamag-md@utfpr.edu.br